

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Dynamique des Fluides

Présentée et soutenue par :
Sophie Roman

le : jeudi 13 décembre 2012

Titre :
Écoulements de suspensions concentrées de globules rouges en micro-
canaux : étude expérimentale

Ecole doctorale :
Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :
Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse

Directeur(s) de Thèse :
Sylvie Lorthois, Chargée de recherche CNRS-IMFT, Directrice de thèse
Frédéric Risso, Directeur de recherche CNRS-IMFT, Co-directeur de thèse

Rapporteurs :
Chaouqi Misbah, Directeur de recherche CNRS-LiPhy
Olivier Theodoly, Chargé de recherche CNRS-INSERM

Membre(s) du jury :
Chaouqi Misbah, Directeur de recherche CNRS-LiPhy, rapporteur
Olivier Theodoly, Chargé de recherche CNRS-INSERM, rapporteur
Anne-Virginie Salsac, Chargée de recherche CNRS-BMBI, examinateur
Anne-Marie Gué, Directeur de recherche LAAS, examinateur
Sylvie Lorthois, Chargée de recherche CNRS-IMFT, Directrice de thèse
Frédéric Risso, Directeur de recherche CNRS-IMFT, Co-directeur de thèse

”Or, de toutes les sciences que l’homme peut et doit savoir, la principale, c’est la science de vivre de manière à faire le moins de mal et le plus de bien possible ; et de tous les arts, celui de savoir éviter le mal et produire le bien avec le moins d’efforts possible.”
Lettre de Léon Tolstoï à Romain Rolland, 1887.

À mon père,

Résumé

Le sang est une suspension concentrée (45 % en volume) de cellules déformables, les globules rouges, dans un liquide newtonien, le plasma. Dans la microcirculation, *i.e.* le sous-ensemble du système de circulation sanguine où s'effectuent les échanges de matière entre le sang et les tissus, les diamètres des vaisseaux sont inférieurs à 100 μm , ce qui est proche de la taille d'un globule rouge ($\approx 10 \mu\text{m}$). En conséquence, les effets dynamiques liés à la présence de ces cellules induisent des comportements rhéologiques complexes, qui jouent un rôle important dans le transport de l'oxygène vers les tissus. En particulier, aux bifurcations microvasculaires divergentes, les débits de globules rouges et de plasma peuvent se répartir de façon non proportionnelle entre les deux branches filles. La fraction volumique de globules rouges (hématocrite) dans l'une des branches filles est alors plus élevée que celle de la branche d'entrée, et la fraction volumique dans l'autre branche y est plus faible. Cet effet, connu sous le nom d'effet de séparation de phase, induit une très grande hétérogénéité de l'hématocrite d'un vaisseau à l'autre dans la microcirculation. Il induit également un couplage entre l'architecture du réseau microvasculaire et la dynamique de l'écoulement sanguin dans ce réseau.

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier finement l'effet de séparation de phase *in vitro*, dans un régime représentatif des conditions physiologiques, au moyen de dispositifs microfluidiques modélisant les bifurcations microvasculaires et de suspensions de globules rouges. Dans ce but, un dispositif expérimental microfluidique a d'abord été élaboré. Puis, les aspects métrologiques spécifiques aux suspensions concentrées ont été abordés afin de quantifier les paramètres de l'écoulement. En particulier, la technique de *dual-slit* a été comprise et optimisée, assurant une mesure précise de profils de vitesse de globules rouges en microcanaux. Des métrologies spécifiques à nos conditions expérimentales ont également été mises en place pour déterminer l'hématocrite. Ces techniques ont été validées par vérification du principe de conservation de la masse entre les trois branches d'une bifurcation, et elles nous ont permis de caractériser les écoulements de globules rouges dans des micro-canaux de différentes tailles (10 à 100 μm) pour de larges gammes de débits et de concentrations. Enfin, l'écoulement de suspensions de globules rouges a été étudié au niveau de micro-bifurcations, dans l'objectif de caractériser l'effet de séparation de phase pour des tailles de canaux et des gammes d'hématocrites qui n'ont pas été étudiés auparavant en conditions d'écoulement maîtrisées.

Mots clés : microcirculation, *dual-slit*, vélocimétrie, microfluidique, séparation de phase.

Abstract

Blood is a concentrated suspension (45% by volume) of deformable red blood cells, flowing in a Newtonian fluid called plasma. The microcirculation is the part of the blood circulation system where the exchanges of material (*e.g.* nutrients, oxygen) between the blood and tissues take place. The microvessels are characterized by diameters less than 100 microns, which is similar in size to the size of a red blood cell (≈ 10 microns). As a result, the presence of these cells considerably influences the dynamics of microvascular flows and induces complex rheological behaviors. In particular, at diverging microvascular bifurcations, red blood cells and plasma may be nonproportionally distributed between two daughter vessels : one gets a higher red blood cell volume fraction (hematocrit) than the feeding vessel, while the other gets a lower one. This effect, known as the phase separation effect, causes a tremendous heterogeneity of the hematocrit among vessels in microvascular networks and induces a coupling between the microvascular architecture and the blood flow dynamics.

The aim of this thesis is to investigate the phase separation effect *in vitro*, in physiological conditions, using red blood cell suspensions and microfluidic devices modeling microvascular bifurcations. For this purpose, a microfluidic experimental device was first developed. Then the metrological aspects specific to concentrated suspensions were addressed in order to quantify all the flow parameters. In particular, the *dual-slit* technique has been understood and optimized, ensuring accurate measurement of velocity profiles of red blood cells in microchannels. Measurement methods for our experimental conditions were also implemented to determine the hematocrit. All these techniques have been validated by verification of the principle of mass conservation between the three branches of a bifurcation. They allowed us to characterize the flow of red blood cells in microchannels of different sizes (10 to 100 microns) and for wide ranges of flow rates and concentrations. Finally, the flow of red blood cell suspensions was investigated at micro-bifurcations, with the aim of characterizing the phase separation effect for channel sizes and hematocrit ranges never studied in controlled flow conditions.

Keywords : microcirculation, *dual-slit*, velocimetry, microfluidic, phase separation.

Remerciements

Le travail de recherche présenté dans ce manuscrit a été financé par une allocation de recherche ministérielle et a été réalisé à l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse dans le Groupe d'Étude sur les Milieux Poreux. C'est donc tout naturellement que je commence par remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce travail et sans qui cette thèse n'aurait pas pu être réalisée.

Je remercie sincèrement ma directrice de thèse, Sylvie Lorthois, merci pour tout ce que j'ai appris au cours de cette thèse. Je te remercie pour ta disponibilité, ta rigueur et ta confiance qui m'ont permis d'avancer. Je tiens également à remercier Frédéric Risso, codirecteur de thèse, merci en particulier pour nos discussions toujours très enrichissantes et productives. Je remercie Paul Duru, qui m'a initié à la microfluidique expérimentale, merci de m'avoir transmis ton savoir-faire expérimental et merci pour ton implication générale dans la thèse.

Un grand merci à Sébastien Cazin, pour m'avoir accordé de son temps (si précieux), pour les nombreux montage/démontage de caméra et pour son aide sur l'acquisition et le traitement des images. Merci également à Ruddy Soeparno, notamment pour le montage du banc qui a (très bien) supporté la lourde caméra rapide au dessus du microscope. Je tiens également à remercier Dominique Anne-Archard pour le temps passé à m'apprendre à réaliser des mesures de viscosité avec le rhéomètre du laboratoire et à discuter des mesures. Je remercie Aurélie et Constant du LGC qui m'ont enseigné leurs techniques de fabrication de micro-systèmes en PDMS.

Merci au personnel du LAAS de m'avoir accueilli dans leur « plateforme micro et nanotechnologies » où j'ai été formée au processus de photolithographie pour la réalisation des micro-canaux. Dans ce cadre, un grand merci à David Bourrier pour les conseils et discussions sur la géométrie et la fabrication des micro-canaux. Merci également à Adrian Laborde avec qui j'ai appris les techniques de photolithographie.

Un grand merci à Lucie Campagnolo avec qui ce fut un plaisir de collaborer pour la comparaison de nos techniques de mesures de micro-écoulements, merci pour ton enthousiasme et ta bonne humeur, je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Chaouqi Misbah et Olivier Théodoly pour avoir rapporté sur ce travail de thèse, merci également à Anne-Virginie Salsac et Anne-Marie Gué pour avoir accepté de participer au jury de mes travaux de thèse. Merci pour

le temps que vous avez consacré à la lecture du manuscrit et pour vos remarques et commentaires lors de la soutenance.

Au cours de ces trois années de thèse, j'ai également enseigné à l'IUT Mesures Physiques de l'Université Paul Sabatier en tant que monitrice. Merci à toute l'équipe enseignante et en particulier à Jean-Pierre Gardou qui supervisait les TP auxquels j'ai participé. J'ai apprécié l'accueil et la disponibilité des enseignants à mon arrivée pour me former sur les manips, et j'ai ensuite pu apprécier la confiance que l'on m'a accordée. Merci en particulier à Philippe Garnier, Philippe Pinelli, Valérie Samouillan, Jean-Paul Nieto, Gonzague Aguez, Yoann Petitjean, Alain Hui Bon Hoa, Robert Mauricot, Joël Duffaut, Thierry Baudon et Teddy Borr, avec qui j'ai pu avoir le plaisir d'animer les TP, de discuter et/ou de collaborer à la mise en place des TP et des évaluations.

Je souhaite à présents remercier les personnes qui m'ont accueillie dans leur laboratoire pour des discussions ou collaborations. Merci à Robert Owens de nous avoir chaleureusement accueillies, Sylvie et moi, à l'Université de Montréal. Ce séjour fut très enrichissant et motivant professionnellement. Nous avons profité de ce séjour à Montréal pour passer par l'Université de Cornell, merci à Abraham Stroock pour son accueil et merci à toutes les personnes que nous avons rencontrées à cette occasion.

Dans le cadre du GDR « Interactions Fluides Structures Biologiques », je souhaite remercier Yannick Knapp pour son accueil à Marseille dans l'équipe Biomécanique de l'IRPHE où nous avons testé la technique de PIV sur mes séquences d'images d'écoulements de globules rouges. J'ai beaucoup apprécié ces quelques jours à l'IRPHE. Merci également à Jules Dupire pour la visite guidée de quelques expériences conduites au laboratoire Adhésion & Inflammation à Marseille.

Je continue en remerciant les collègues du GEMP qui ont accompagnés ces trois années de thèse : Cyprien Soulaïne, Arnaud Pujol, Stéphanie Véran-Tissoires, Yohann Le Gac, Marion Musielak, Suzy Bernard, Ruddy Soeparno, Hai Shan Luo, Hossein Davarzani, Florent Hénon, Paul Sapin, Philippe Lefort, Lætitia Mottet, Benjamin Straubhaar, Mauricio Duenas Velasco, Samuel Corman, Ninon Moura, Jianwei Guo, merci beaucoup pour tous les bons moments passés en votre compagnie !

Mes remerciements vont ensuite à ma famille, qui m'a toujours encouragée et soutenue dans mes choix. En particulier merci à mes parents, ma sœur, ma grand-mère, Nadine et Jeannot, qui sont venus m'encourager à ma soutenance de thèse, merci également à ma cousine Sarah. Je souhaite aussi remercier mes amis présents (de près ou de loin) à mes côtés : un grand merci à Jean-Luc et Davy, merci à tous les deux d'être venu de Paris pour Le grand jour, merci également à Claire, Chloé, Fanny, Delphine, et Sophie.

Pour finir, Cyprien, merci pour les nombreuses relectures, un grand merci pour m'avoir épaulée et encouragée, surtout pendant les moments un peu plus difficiles de la thèse. Je suis heureuse de partager chacune de mes journées avec toi. Merci !

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Remerciements	vii
Table des matières	ix
Introduction	1
1 Introduction à la microcirculation	3
1.1 La microcirculation : structure et transport	3
1.1.1 Le sang	3
1.1.1.1 Les éléments figurés du sang	5
1.1.1.2 Le plasma	5
1.1.1.3 Agrégation et sédimentation des globules rouges	6
1.1.2 Architecture et organisation microvasculaire	6
1.1.3 Régulation de l'écoulement dans les réseaux microvasculaires . . .	9
1.1.4 Écoulement du sang dans les microvaisseaux	9
1.1.4.1 L'hématocrite dans la microcirculation	10
1.1.4.2 Effet Fåhræus	10
1.1.4.3 Effet Fåhræus/Lindqvist	11
1.1.4.4 Profils de vitesse dans les microvaisseaux	13
1.1.5 Écoulement du sang dans les réseaux microvasculaires	13
1.1.5.1 Répartition des flux de globules rouges au niveau des bifurcations	13
1.1.5.2 Effet Fåhræus réseau	15
1.1.5.3 Écoulement dans les réseaux microvasculaires : conclusion	15
1.1.6 Conclusion	16
1.2 La microfluidique : un moyen d'étude de la microcirculation	16
1.2.1 Les microsystèmes en PDMS	17
1.2.2 Modèles <i>in vitro</i> de la microcirculation	17

TABLE DES MATIÈRES

1.3	La microcirculation : les méthodes d'exploration	19
1.3.1	Mesures de vitesses	20
1.3.1.1	Laser Doppler	20
1.3.1.2	Interférométrie par rétroinjection optique	20
1.3.1.3	Corrélation spatiale : PIV, PTV	21
1.3.1.4	Corrélation temporelle : <i>dual-slit</i>	27
1.3.1.5	Conclusion	28
1.3.2	Mesure de l'hématocrite	29
1.3.2.1	Mesure de l'hématocrite par comptage	29
1.3.2.2	Mesure de l'hématocrite à partir de paramètres dynamiques de l'écoulement	29
1.3.2.3	Mesure de l'hématocrite à partir de la densité optique	30
1.3.2.4	Conclusion	32
1.3.3	Les méthodes de mesure dans la microcirculation : conclusion	32
1.4	Conclusion et objectifs de la thèse	32
1.5	Bibliographie	33
2	Écoulements <i>in vitro</i> de globules rouges en micro-canaux : dispositif expérimental	41
2.1	Les micro-canaux	41
2.1.1	Géométries des micro-canaux	43
2.1.1.1	Canaux uniques droits	43
2.1.1.2	Micro-bifurcations	43
2.1.2	Fabrication des moules par photolithographie	44
2.1.3	Moulage et collage du PDMS	46
2.2	Système fluide	46
2.3	Préparation des suspensions	50
2.4	Visualisation : microscope et caméra	51
2.5	Conclusion	53
2.6	Bibliographie	53
3	Développements métrologiques	55
3.1	Profils de vitesse : validation et optimisation de la technique de <i>dual-slit</i>	56
3.2	Mesure de l'hématocrite de tube	70
3.2.1	Mesure de l'hématocrite par comptage	71
3.2.2	Mesure de l'hématocrite par une méthode photométrique	72
3.2.3	Comparaison des mesures d'hématocrite par la méthode photométrique et par comptage	74
3.2.4	Estimation de l'hématocrite par déduction	76
3.3	Mesures de débits volumiques	76
3.3.1	Débit de globules rouges	77
3.3.1.1	Estimation du débit par comptage	77

3.3.1.2	Estimation du débit à partir du profil de vitesse maximale et de l'hématocrite	77
3.3.1.3	Comparaison des méthodes de mesure du débit de globules rouges	78
3.3.2	Débit de fluide suspendant	81
3.4	Conclusion	82
3.5	Bibliographie	82
4	Écoulements sanguins en micro-canaux : résultats	85
4.1	Mesures de débits et conservation de la masse	85
4.1.1	Conservation des débits de globules rouges	86
4.1.1.1	Mesure du débit par comptage	86
4.1.1.2	Mesure du débit à partir du profil de vitesse des globules rouges (obtenu par <i>dual-slit</i>) et de l'hématocrite de tube	88
4.1.1.3	Débits de globules rouges : conclusion	90
4.1.2	Conservation des débits de fluide suspendant	90
4.1.3	Conservation des débits totaux : mélange globules rouges-fluide	91
4.1.4	Déviation à la conservation de la masse	91
4.1.5	Mesures de débits : conclusion	96
4.2	Profils de vitesse des globules rouges	97
4.2.1	Globules rouges dans des micro-canaux de faible rapport d'aspect	97
4.2.2	Globules rouges dans des micro-canaux à section carrée	98
4.2.2.1	Micro-canaux 20µm×20µm	98
4.2.2.2	Petit micro-canal : section 10µm×10µm	101
4.2.2.3	Influence de la vitesse maximale et de l'hématocrite sur la forme du profil de vitesse	101
4.2.2.4	Globules rouges circulants en agrégats	104
4.2.3	Profils de vitesse de globules rouges : conclusion	104
4.3	Bibliographie	106
5	Effet de séparation de phase au niveau de micro-bifurcations	107
5.1	Effet de séparation : état de l'art	108
5.1.1	Études expérimentales de l'effet de séparation de phase	108
5.1.2	Modèles d'écoulement aux bifurcations microvasculaires	113
5.1.3	Implications et applications de l'effet de séparation de phase	115
5.1.4	Conclusion et objectifs dans l'étude de l'effet de séparation de phase	117
5.2	Méthode d'étude	118
5.3	Étude paramétrique <i>in vitro</i> : résultats	120
5.3.1	Mise en évidence de l'effet de séparation de phase	120
5.3.2	Comparaison des résultats expérimentaux au modèle empirique de Pries et al. (1989)	120

TABLE DES MATIÈRES

5.3.3	Comparaison des résultats expérimentaux au modèle numérique de Doyeux et al. (2011)	125
5.4	Conclusion et perspectives	127
5.5	Bibliographie	128
Conclusion et perspectives		131
Glossaire		135
A Plans des micro-canaux		139
A.1	Micro-canaux uniques, droits	139
A.2	Micro-bifurcations	139
B Milieu de suspension des globules rouges		143
C Calculs d'incertitudes		145
C.1	Incertitude sur la mesure du débit de globules rouges	145
C.2	Incertitude sur la mesure du débit fractionnaire de globules rouges	147
D Comparaison des profils de vitesse obtenus par <i>dual-slit</i>, et par interférométrie par rétroinjection optique		149

Introduction

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Groupe d'Étude sur les Milieux Poreux (GEMP) de l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse (IMFT), il s'intègre dans le thème de la biomécanique des milieux hétérogènes. Parmi ces milieux vivants hétérogènes, on peut citer : le système nerveux central (partie du système nerveux composé de neurones, de cellules et d'un réseau de vaisseaux sanguins), le système ostéo-articulaire (ensemble complexe d'os et d'articulations assurant la structure corporelle et la mobilité), ou encore la microcirculation sanguine (réseau de petits vaisseaux sanguins où ont lieu les échanges de matière avec les tissus environnants).

Cette thèse s'inscrit plus particulièrement dans une problématique d'étude des écoulements sanguins dans la microcirculation cérébrale, qui a des implications dans diverses pathologies impactant l'architecture microvasculaire (hypertension, diabète, Alzheimer, cancer, ...) et en imagerie fonctionnelle cérébrale. Chez les mammifères, le système cardiovasculaire est constitué d'une pompe, le cœur, qui doit maintenir la pression nécessaire à la circulation sanguine, d'un réseau de vaisseaux assurant le transport du sang jusqu'aux organes, constituant la macrocirculation, et d'un réseau de petits vaisseaux sanguins où ont lieu les échanges avec les tissus, formant la microcirculation. Le sang situé au niveau du cœur droit est expulsé vers les poumons où il se charge en oxygène (circulation pulmonaire), puis il est ramené au cœur gauche par le système veineux pulmonaire. A ce niveau, il est envoyé vers les tissus pour les approvisionner (circulation systémique). Les principaux rôles du système cardiovasculaire sont : l'échange de matière avec l'environnement (respiration, digestion, ...), le transport de matière entre les différentes parties du corps (nutriments, déchets, hormones), le transport de chaleur, et le transport de cellules (mécanismes de défense, de régulation). Les plus gros vaisseaux, *i.e.* les artères et les veines, assurent le transport du sang jusqu'aux plus petits vaisseaux, les capillaires, où ont lieu les échanges.

La frontière entre macro- et microcirculation n'a pas de définition précise, mais les microvaisseaux se caractérisent généralement par des diamètres inférieurs à 150 μm . Les vaisseaux capillaires ont eux un diamètre inférieur à 10 μm . Le sang est composé essentiellement de globules rouges, des cellules déformables occupant 45% du volume du sang, circulant dans un liquide newtonien, le plasma. Dans la microcirculation, la dimension des vaisseaux sanguins est comparable à la taille d'un globule rouge. Par conséquent, la dynamique des écoulements sanguins est particulière à cette échelle. Des effets dy-

namiques non linéaires liés à la présence des globules rouges dans ces petits vaisseaux jouent un rôle important dans le transport de l'oxygène vers les organes. Notamment, l'effet de séparation de phase aux niveaux de bifurcations microvasculaires contribue à rendre la fraction volumique de globules rouges (hématocrite) extrêmement hétérogène d'un vaisseau à l'autre, typiquement entre 0% et 80%. En effet, les globules rouges et le plasma peuvent se répartir inégalement entre les deux branches filles d'une bifurcation microvasculaire, l'une d'elles recevant un hématocrite plus élevé que celui de la branche mère et l'autre un hématocrite plus faible. Cet effet induit une grande hétérogénéité des vitesses et des hématocrites dans un réseau microvasculaire. La compréhension et la quantification de l'effet de séparation de phase reste un problème ouvert. Son évaluation est notamment requise pour la simulation d'écoulements sanguins à l'échelle du réseau microvasculaire. L'objectif de cette thèse est d'étudier finement ce phénomène *in vitro*, dans un régime représentatif des conditions physiologiques, régime qui est rarement étudié en conditions d'écoulement maîtrisées.

La thèse s'est déroulée comme suit : un dispositif expérimental microfluidique a été mis au point pour l'étude d'écoulements de suspensions de globules rouges. Les aspects métrologiques spécifiques aux suspensions concentrées ont d'abord été abordés dans l'objectif d'une quantification *in situ* des paramètres de l'écoulement (champs des vitesses et des concentrations, débit). Puis, une étude paramétrique *in vitro* de l'effet de séparation de phase a été réalisée.

Le présent document est organisé en cinq chapitres. Le premier est consacré à la microcirculation sanguine. Nous introduisons les connaissances actuelles sur sa structure, ses fonctions, ses méthodes d'exploration, afin de comprendre pourquoi et par quels moyens nous étudions l'effet de séparation de phase *in vitro*. Le second chapitre décrit le dispositif expérimental mis en place à cette fin. Le chapitre trois détaille les méthodes développées pour mesurer les vitesses, les débits, et les concentrations dans nos micro-canaux. Nous nous intéressons particulièrement à l'optimisation et à la validation de la technique de *dual-slit* pour la mesure de profils de vitesse de globules rouges. Les résultats et validations de ces techniques sont présentés dans le chapitre quatre. Enfin, le chapitre cinq est consacré à l'effet de séparation de phase aux niveau de micro-bifurcations. Nous introduisons ce chapitre par une revue des travaux sur l'effet de séparation de phase. Pour finir, les résultats de l'étude de cet effet *in vitro* sont présentés et commentés.

Chapitre 1

Introduction à la microcirculation

La microcirculation, en opposition à la macrocirculation, fait généralement référence aux vaisseaux dont le diamètre est inférieur à 150 μm . La microcirculation comprend tous les types de petits vaisseaux : les artérioles qui naissent d'une artère (vaisseau qui conduit le sang du cœur aux tissus) pour la relier aux capillaires (les plus fins et plus petits vaisseaux), et les veinules, de petites veines qui ramènent le sang vers le cœur, voir figure 1.0.1. Ces vaisseaux ont pour fonction principale le transport et l'échange de matière. L'eau et les solutés (dont l'oxygène) sont amenés aux capillaires par le sang et échangés avec le tissu environnant à travers la paroi des vaisseaux. Cette fonction de transport est très dépendante de l'architecture microvasculaire et de la dynamique des écoulements sanguins. La deuxième fonction principale de la microcirculation est la régulation de ces échanges. L'étude de la microcirculation passe par la connaissance et la compréhension de son anatomie, par l'étude de l'hémodynamique (*i.e.* la dynamique du sang) et des mécanismes de régulation. Nous proposons dans ce chapitre une présentation des connaissances actuelles sur la microcirculation : nous décrivons tout d'abord sa structure et sa fonction de transport, puis ses méthodes d'exploration à l'échelle d'un vaisseau. Pour conclure, nous introduisons les objectifs de la présente thèse et les moyens envisagés pour les atteindre.

1.1 La microcirculation : structure et transport

1.1.1 Le sang

Le sang est composé de cellules, les éléments figurés, circulant dans un liquide appelé le plasma. Les éléments figurés constituent en moyenne 45% du sang (en volume).

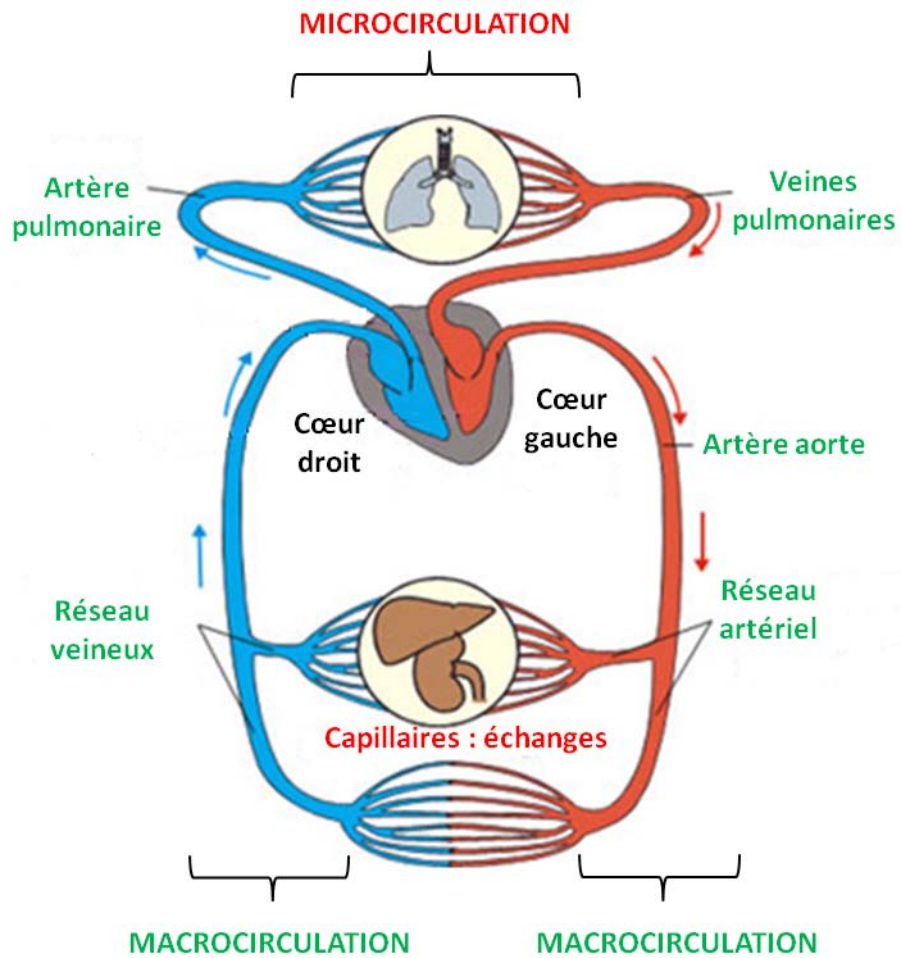


FIGURE 1.0.1: **Schéma de la circulation sanguine**, les légendes en vert correspondent aux vaisseaux de la macrocirculation, celles en rouge aux vaisseaux de la microcirculation.

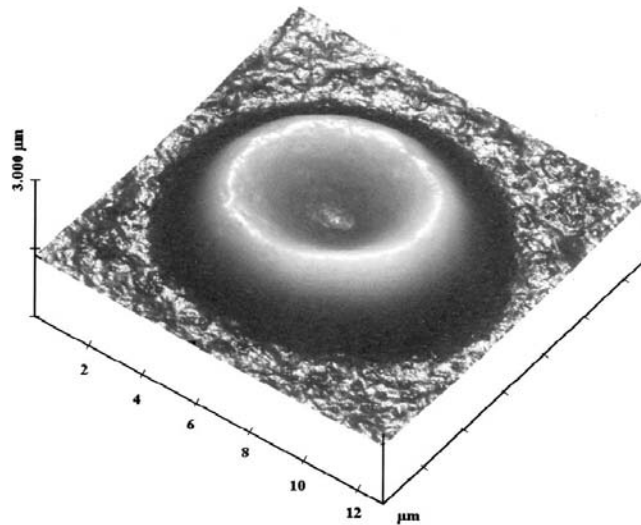


FIGURE 1.1.1: Globule rouge humain vue par microscopie à force atomique, d'après Touhami et al. (2002).

1.1.1.1 Les éléments figurés du sang

- Les globules rouges (appelés aussi hématies ou érythrocytes) sont des disques biconcaves de 6 à 8 μm de diamètre, et de 1 à 3 μm d'épaisseur (Touhami et al., 2002, voir figure 1.1.1). Ils ne contiennent ni noyau, ni organite. La membrane viscoélastique des globules rouges enveloppe une solution d'hémoglobine qui permet de transporter l'oxygène, le fer, ou encore le dioxyde de carbone. Les globules rouges amènent l'oxygène des poumons aux tissus, où ils récupèrent une partie du dioxyde de carbone pour le ramener vers les poumons et l'évacuer, le reste de dioxyde de carbone est transporté sous forme dissoute ou d'ions bicarbonates. Les globules rouges sont très déformables. Ils peuvent ainsi circuler dans des capillaires de moins de 8 μm de diamètre. L'hématocrite moyen, *i.e.* le pourcentage de volume occupé par les globules rouges circulant dans un volume donné de sang, est de 45 % chez l'Homme.
- Les globules blancs, ou leucocytes, représentent un ensemble de cellules impliquées dans la réponse immunitaire. En conditions normales, ils représentent 0,1% du volume sanguin.
- Les plaquettes, ou thrombocytes, interviennent dans le phénomène de coagulation sanguine. Ce ne sont pas des cellules complètes, mais des petits fragments de cellules, constituant 0,4% du volume sanguin.

1.1.1.2 Le plasma

Le reste du sang est composé de plasma, un fluide newtonien constitué à plus de 90% d'eau, et d'une grande variété de solutés. On y trouve des solutés minéraux (oligoéléments et ions dissous), les gaz respiratoires (O_2 et CO_2), et des solutés organiques (nutriments,

déchets métaboliques, hormones, protéines plasmatiques), d'après Campbell and Reece (2004).

La concentration totale en ions dans le plasma, et la présence de certaines protéines plasmatiques, comme l'albumine, sont des facteurs importants pour le maintien de l'équilibre osmotique du sang, c'est-à-dire pour le maintien de l'équilibre de concentration en ions de part et d'autre des membranes des éléments figurés. L'albumine est la protéine présente en plus grande quantité dans le plasma (environ 60% des protéines plasmatiques), comme certains ions et d'autres protéines, elle a également un effet tampon et contribue à maintenir le pH sanguin entre 7,35 et 7,45. Les ions sont aussi nécessaires à l'excitabilité des membranes et à l'activité de certaines enzymes. Les protéines plasmatiques peuvent avoir d'autres fonctions essentielles pour l'organisme : transport de molécules, immunité, rôle dans la coagulation sanguine.

1.1.1.3 Agrégation et sédimentation des globules rouges

Les globules rouges peuvent former des agrégats sous formes de rouleaux, comme on peut le voir sur la figure 1.1.2, ou sous forme de structures tridimensionnelles et complexes. L'agrégation erythrocytaire est un phénomène physiologique et réversible. Elle se produit essentiellement lorsque les vitesses de cisaillement et les débits sont faibles. Quand ceux-ci augmentent les rouleaux se désagrègent (Popel and Johnson, 2005). Au cours de l'agrégation, les globules seraient liés par l'adsorption de macromolécules à la surface de deux cellules adjacentes. Le fibrinogène, une protéine plasmatique, est connu pour amplifier l'agrégation lorsqu'il est présent en grande quantité (Goldstone et al., 1970). En condition d'écoulement, une augmentation de l'agrégation change la distribution de l'hématocrite à l'échelle du vaisseau. Une agrégation intense est pathologique, elle entraîne une augmentation de la viscosité sanguine, qui est associée à plusieurs maladies (thrombose, diabète, athérosclérose). L'agrégation peut aussi moduler le phénomène de sédimentation des globules rouges dans les vaisseaux, qui vient d'une différence de densité entre les globules et le plasma. D'ailleurs, la mesure de la vitesse de sédimentation est indicatrice de l'inflammation. En effet, lors d'un processus inflammatoire, le taux de fibrinogène augmente, faisant s'agréger les globules rouges qui sédimentent alors plus vite.

Nous avons décrit les caractéristiques et propriétés du sang, nous allons voir à présent en quoi la connaissance et la compréhension de l'architecture et de l'organisation des réseaux microvasculaires sont essentielles pour caractériser la dynamique des écoulements sanguins dans la microcirculation.

1.1.2 Architecture et organisation microvasculaire

Dans la microcirculation, les vaisseaux s'organisent en un réseau complexe, généralement en trois dimensions (cf. figure 1.1.3). Un réseau microvasculaire est nourri par une

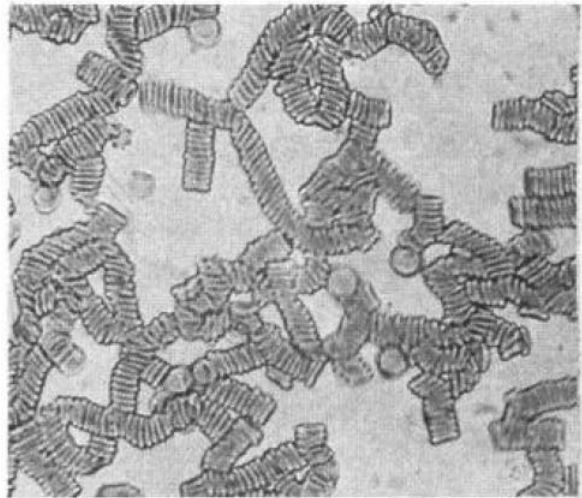


FIGURE 1.1.2: **Globules rouges en rouleaux, d'après Fahraeus (1929)** : étude microscopique d'une goutte de sang. Le sang, recueilli sur un volontaire sain, montre la formation de rouleaux de globules rouges.

ou plusieurs artérioles ou artères, et est drainé par une ou plusieurs veinules ou veines. A titre d'exemple, la vascularisation est très importante dans les reins et dans le cerveau, où elle reçoit respectivement 22 et 15% du volume de sang éjecté à chaque contraction cardiaque, alors que ces organes ne représentent que 0,4% et 2% de la masse du corps (Popel and Johnson, 2005). Les plus gros vaisseaux de la microcirculation (diamètre $> 10\mu\text{m}$) ont une structure arborescente. Les plus petits, les capillaires, sont eux caractérisés par l'existence de multiples bifurcations, de nombreux capillaires transversaux joignent des capillaires voisins.

Les trois types de vaisseaux de la microcirculation : artérioles, capillaires et veinules, présentent une structure et des fonctions qui leur sont propres.

- Le réseau artériolaire amène le sang, chargé en dioxygène, aux capillaires. Les muscles lisses de la paroi des artérioles sont reliés au centre nerveux par des fibres sympathiques. Sous l'action d'une augmentation ou d'une diminution de la stimulation sympathique, les muscles lisses se contractent ou respectivement se relâchent, ce qui entraîne un changement du diamètre de la lumière de l'artériole. Cette propriété de vasomotricité fait varier le débit sanguin dans l'artériole et par conséquent dans le circuit capillaire. Le diamètre des artérioles est compris entre 15 et 150 μm , ce diamètre décroît lorsqu'on se rapproche du réseau capillaire. La vitesse du sang dans les artérioles varie approximativement de 7 à 40 mm/s (Vayssairat and Carpentier, 1996; Popel and Johnson, 2005).
- Les capillaires, les plus petits des vaisseaux, ont une paroi relativement souple et élastique composée d'une seule couche de cellules (l'endothélium), entourée d'une fine membrane basale. Cette paroi est si fine que les molécules d'eau, d'oxygène et de

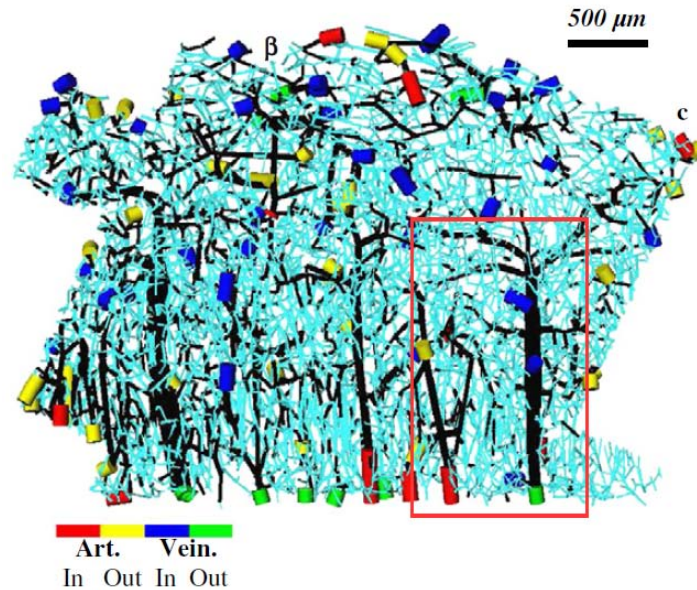


FIGURE 1.1.3: Représentation d'un réseau microvasculaire humain, d'après Lorthois et al. (2011), les segments capillaires sont en bleu clair et les non-capillaires en noirs. Les cylindres colorés indiquent les extrémités des segments artériolaires et veinulaires.

certaines lipides la traversent par diffusion. Les diamètres des capillaires se situent typiquement entre 2 et 9 μm (Vayssairat and Carpentier, 1996; Lorthois et al., 2011), et leur répartition est très hétérogène au sein d'un réseau microvasculaire. La vitesse du sang peut elle aussi beaucoup varier d'un capillaire à l'autre. Les faibles vitesses d'écoulement du sang rencontrées dans les capillaires, entre 0 et 400 $\mu\text{m/s}$ (Vayssairat and Carpentier, 1996), assurent un temps de séjour suffisant à la réalisation des échanges avec les tissus.

- Les veinules collectent le sang à l'issue du réseau capillaire pour l'amener aux veines. Les plus petites veinules, juste en sortie des capillaires, n'ont pas de couche de cellules musculaires lisses (contrairement aux plus grandes veinules), et permettent ainsi certains échanges. Le diamètre des veinules est du même ordre de grandeur que celui des artérioles (de la dizaine à la centaine de microns), par contre les écoulements y sont moins rapides, de l'ordre de 1 mm/s (Popel and Johnson, 2005).

Comme nous l'avons souligné auparavant, les deux fonctions principales de la microcirculation sont : le transport et les échanges de matières, que nous venons d'aborder, et une fonction de régulation de ces échanges, qui fait intervenir une régulation à court-terme et une régulation à long-terme, que nous évoquons à présent.

1.1.3 Régulation de l'écoulement dans les réseaux microvasculaires

Tout comme la pression artérielle qui est en permanence régulée au niveau de la macrocirculation (de façon nerveuse, hormonale ou encore intrinsèque), l'écoulement dans les réseaux microvasculaires présente des mécanismes de régulation (Popel and Johnson, 2005).

Régulation à court terme

La base de la régulation du débit sanguin est que la résistance vasculaire dépend du diamètre. Lorsque les cellules musculaires lisses n'entrent pas en jeu, les vaisseaux répondent passivement aux changements de pression transmurale (différence entre les pressions extra- et intravasculaire). Le diamètre augmente quand la pression transmurale augmente et inversement. Lorsque des cellules musculaires lisses sont présentes, et actives, les artérioles (et artères) peuvent répondre aux changements de pression par une constriction quand la pression augmente ou une dilatation quand elle diminue, c'est ce que l'on appelle les mécanismes myogéniques. Des facteurs métaboliques entrent aussi en jeu dans les changements de diamètres des vaisseaux. Le monoxyde d'azote, par exemple, qui peut être libéré par l'endothélium, est le principal agent jouant sur le diamètre des vaisseaux. L'interaction complexe entre les mécanismes myogéniques, les facteurs métaboliques et le taux de cisaillement, définit le niveau de pression artérielle local, répartissant le flux sanguin en fonction des besoins métaboliques. De plus, dans les capillaires il existe des sphincters pré-capillaires, de petits anneaux musculaires contractiles à la naissance du capillaire, qui interviendraient dans la régulation de l'écoulement en réagissant à des stimuli nerveux ou hormonaux.

Régulation à long terme

Une régulation à long terme existe aussi : le remodelage vasculaire et l'angiogenèse (la croissance de nouveaux vaisseaux). Le réseau vasculaire peut s'adapter en réponse à des facteurs comme des changements prolongés de la pression artérielle, une ischémie (diminution de l'apport sanguin) ou une hypoxie (diminution de l'apport en oxygène), ou encore une tumeur. Peuvent alors se produire des changements structuraux de la paroi vasculaire, des changements de topologie par angiogenèse, ou encore le remodelage des vaisseaux existants.

Nous nous intéressons maintenant aux caractéristiques des écoulements sanguins, à l'échelle du petit vaisseau d'abord, puis à l'échelle du réseau microvasculaire.

1.1.4 Écoulement du sang dans les microvaisseaux

La taille des globules rouges, comparée à celle des vaisseaux, influence fortement les propriétés de l'écoulement lorsque les diamètres sont inférieurs à 200 μm . Un des effets

remarquables est la formation d'une couche de plasma (ou de faible hématoците) près des parois d'un vaisseau. Les interactions entre les globules rouges et la paroi, et entre globules voisins, sont à l'origine d'une concentration en globules rouges plus importante au centre du vaisseau. Ce phénomène est appelé migration axiale, il joue un rôle dans la diminution de l'hématocrite intravasculaire (effet Fåhræus) et la diminution de la viscosité avec le diamètre (effet Fåhræus-Lindqvist).

1.1.4.1 L'hématocrite dans la microcirculation

Dans la microcirculation, où la taille des globules rouges n'est pas négligeable par rapport à la taille du vaisseau, on distingue l'hématocrite de tube (H_t) et l'hématocrite de débit (H_d). L'hématocrite de tube représente la fraction volumique de globules rouges contenue dans un segment donné d'un vaisseau, alors que l'hématocrite de débit, ou hématoците de réservoir, indique le rapport entre le débit de globules rouges et le débit sanguin total. Comme nous allons le voir dans ce qui suit, l'hématocrite de tube est inférieur à l'hématocrite de débit dans les petits vaisseaux.

Dans la microcirculation, l'hématocrite est un paramètre particulièrement important du point de vue de la rhéologie comme de la distribution de l'oxygène. De nombreux travaux, dont ceux de Desjardins and Duling (1987), ont mis en évidence une baisse progressive de l'hématocrite moyen lorsqu'on passe du réseau artériel, au réseau artériolaire, puis capillaire. Des mesures chez le chat ont montré que, pour un hématoците systémique de l'ordre de 40%, la valeur moyenne de l'hématocrite dans le réseau capillaire est inférieure à 20% (Lipowsky et al., 1980). Il existe surtout une grande hétérogénéité des hématoцитres locaux dans un réseau capillaire (Kanzow et al., 1982). Ces variations d'hématocrite (fluctuations de l'hématocrite moyen et hétérogénéité de l'hématocrite local), ont historiquement été étudiées avec les travaux de Fåhræus (1929), à l'échelle du vaisseau unique. Ces résultats et de nombreux travaux anciens ont été obtenus dans des capillaires en verre dont le diamètre était représentatif de celui des artérioles et des veinules.

1.1.4.2 Effet Fåhræus

En 1929, Fåhræus mit en évidence que l'hématocrite de tube moyen dans un capillaire en verre est inférieur à l'hématocrite moyen du sang circulant dans un tube de plus grand diamètre, et ce pour un même hématoците d'entrée (Fahraeus, 1929). Barbee and Cokelet (1971) ont analysé expérimentalement cet « effet Fåhræus ». Ils tirent de cette étude que, en écoulement stationnaire, et pour un diamètre de tube donné, l'hématocrite de tube moyen varie linéairement avec l'hématocrite de débit. De plus, Barbee and Cokelet (1971) mettent en évidence que l'hématocrite de tube local dépend de la position radiale dans le tube. La migration axiale des globules rouges dans un capillaire a pour conséquence que la vitesse moyenne des globules (v_{GR}) est plus élevée que celle du sang (v_{sang}). Cela amène à une diminution du nombre de globules rouges contenus dans un segment capillaire (et

donc à une diminution de l'hématocrite de tube (H_t) par rapport au nombre de globules entrant ou sortant de ce segment (l'hématocrite de débit H_d). Ce phénomène peut être également traduit par le fait que le temps de transit moyen des globules rouges (t_{GR}) est inférieur au temps de transit moyen (t_{sang}) du sang dans un segment de microvaisseau. L'effet Fåhræus peut donc être décrit par l'équation suivante :

$$\frac{H_t}{H_d} = \frac{t_{GR}}{t_{sang}} = \frac{v_{sang}}{v_{GR}} < 1.$$

Plus tard, Pries et al. (1990) ont relié ce ratio au diamètre du vaisseau et à l'hématocrite de débit, par une relation empirique complexe. Ils utilisent pour cela des résultats obtenus pour un écoulement de suspensions de globules rouges dans des microtubes en verre.

1.1.4.3 Effet Fåhræus/Lindqvist

En 1931, Fåhræus et Lindqvist étudièrent l'influence du diamètre d'un tube en verre sur la viscosité du sang qui circule dans celui-ci. Les données de ce type d'études sont présentées en termes de la viscosité apparente (η_{app}), qui est définie comme la viscosité du fluide newtonien circulant dans un tube de même diamètre, de même longueur, sous la même différence de pression, et avec le même débit. Elle est déduite de l'ajustement entre la mesure de la différence de pression (ΔP) et du débit (Q) grâce à l'équation de Poiseuille pour un tube de diamètre D :

$$\eta_{app} = \frac{\pi D^4 \Delta P}{128 Q L}. \quad (1.1.1)$$

Les résultats sont généralement représentés en termes de viscosité apparente relative, c'est-à-dire la viscosité apparente normalisée par la viscosité du plasma (Pries et al., 1992).

L'étude de Fahraeus and Lindqvist (1931) montre que, pour un diamètre de tube inférieur à 300 μm , la viscosité du sang décroît avec le diamètre du tube, c'est l'effet Fåhræus-Lindqvist. Par la suite, de nombreuses études *in vitro* ont confirmé cet effet et ont montré que la viscosité du sang continue de décroître jusqu'à des diamètres de tube de l'ordre de 10 μm . Puis, il a été mis en évidence (Gaehtgens, 1980) que la viscosité atteint un minimum pour des capillaires de 5 à 7 μm de diamètres. Ensuite, pour des diamètres inférieurs à 5 μm , la viscosité augmente quand le diamètre diminue, on appelle ce phénomène l'inversion de Fåhræus/Lindqvist (Pries et al., 1992, voir figure 1.1.4).

La diminution de la viscosité apparente du sang avec le diamètre est en partie liée au phénomène de migration des globules rouges au centre du canal, et à la formation d'une couche d'exclusion plasmatique aux parois. En effet, la viscosité de la couche dépourvue de cellules (ou de plus faible hématocrite) près des parois est inférieure à la viscosité du noyau de globules rouges, plus concentré, qui circule au centre du vaisseau.

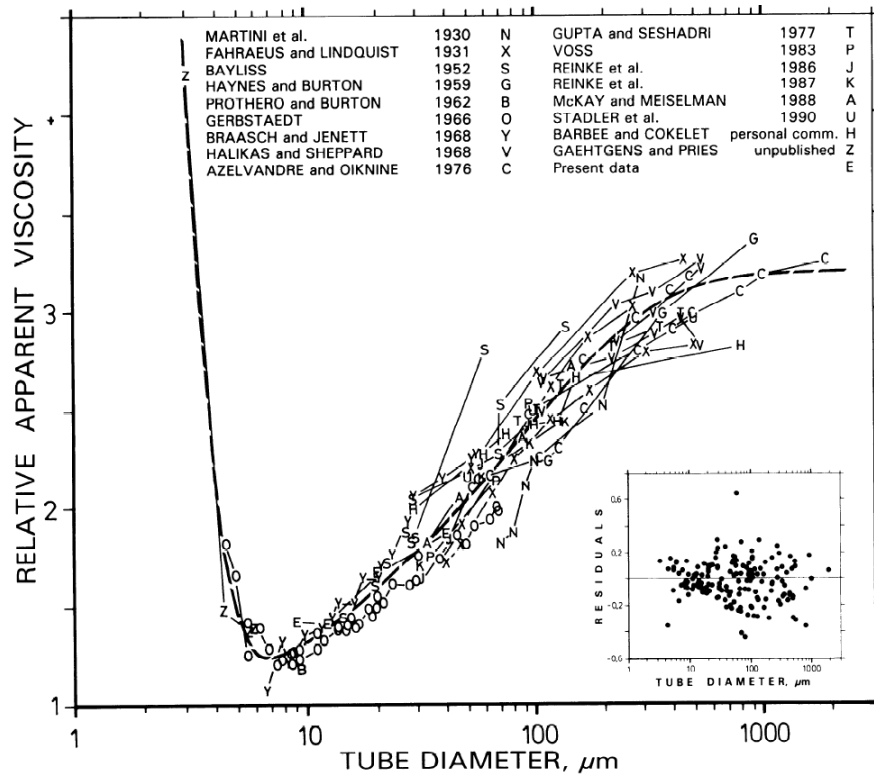


FIGURE 1.1.4: **Effet Fåhræus-Lindqvist, d'après Pries et al. (1992).** Viscosité apparente relative de suspensions de globules rouges circulant dans des tubes en verres de différents diamètres, pour un hémocrite de débit de 45%. La courbe représente la loi phénoménologique associée, et les ronds sont les valeurs expérimentales.

En conséquence, la viscosité apparente du sang qui circule dans un petit vaisseau est inférieure à la viscosité de la même suspension dans un tube de plus grand diamètre, où la répartition des globules est uniforme. Pour les diamètres inférieurs à 5 μm , les globules circulent en file indienne et se déforment beaucoup, ce qui explique l'augmentation de la viscosité avec la diminution du diamètre.

La viscosité apparente dépend de l'hématocrite, du diamètre du tube et du débit (ou du gradient de pression). Une relation empirique entre ces paramètres, assez complexe, a été établie par Pries et al. (1992), à partir de diverses données expérimentales, voir la courbe pointillée sur la figure 1.1.4.

Plus récemment, des modèles d'écoulements de globules rouges dans des capillaires en présence de glycocalyx (couche de glucides liée à la paroi endothéliale) ont été réalisés par Feng and Weinbaum (2001); Secomb et al. (2002). Ces modèles montrent notamment que la résistance à l'écoulement est jusqu'à huit fois plus grande dans un capillaire avec une couche de glycocalyx que dans un tube en verre de même diamètre. *In vivo*, la résistance à l'écoulement dans un microvaisseau dépend donc essentiellement de la viscosité du sang, de la longueur et du rayon du vaisseau, mais aussi du taux de cisaillement aux

parois qui est influencé par les propriétés du glycocalyx et des macromolécules associées.

1.1.4.4 Profils de vitesse dans les microvaisseaux

Écoulement dans les artérioles et les veinules

Dans leur revue sur la microcirculation, Popel and Johnson (2005) soulignent que, dans les artérioles, l'écoulement varie périodiquement avec le cycle cardiaque. Par ailleurs, des mesures dans des artérioles de moins de 60 μm de diamètre (Pittman and Ellsworth, 1986; Schmid-schoenbein and Zweifach, 1975) ont montré que les profils de vitesse sont plus aplatis que pour un écoulement de Poiseuille. De même que dans les artérioles, des profils de vitesse aplatis ont été rapportés dans les veinules (Schmid-schoenbein and Zweifach, 1975). Par ailleurs, le taux de cisaillement y est peu élevé car l'intérieur des veinules est assez larges. L'aplatissement des profils de vitesses des globules rouges est d'autant plus marqué que le diamètre du vaisseau est petit, que le débit est faible et que l'hématocrite est grand, comme cela a été montré *in vitro* par Goldsmith and Marlow (1979), voir figure 1.1.5. Ces profils de vitesse montrent l'existence d'un amas concentré de globules rouges, plus ou moins large, avançant à la vitesse maximale au centre du canal. Hors du centre, la vitesse des globules rouges diminue quand on se rapproche des parois.

Écoulement dans les capillaires

Les globules rouges passent un par un et peuvent se déformer fortement dans les capillaires (voir exemple *in vitro*, section suivante figure 1.2.1 B et C), leur profil de vitesse est donc plat dans ces vaisseaux. Les interactions entre les globules rouges et la paroi du capillaire y sont importantes.

1.1.5 Écoulement du sang dans les réseaux microvasculaires

On trouve une grande hétérogénéité des vitesses des globules rouges et des hématocrites entre les différents segments vasculaires d'un réseau, qui sont dues en partie au caractère asymétrique des réseaux microvasculaires.

Une des caractéristiques des écoulements microcirculatoires est la répartition inégale des globules rouges et du plasma au niveau des bifurcations, c'est l'effet de séparation de phase.

1.1.5.1 Répartition des flux de globules rouges au niveau des bifurcations

Au niveau d'une bifurcation microvasculaire, les globules rouges et le plasma peuvent être distribués de façon inégale entre les vaisseaux filles. Une branche fille peut ainsi recevoir une fraction volumique de globules rouges plus élevée que celle de la branche mère, et l'autre une fraction plus faible. Une conséquence de l'effet de séparation de

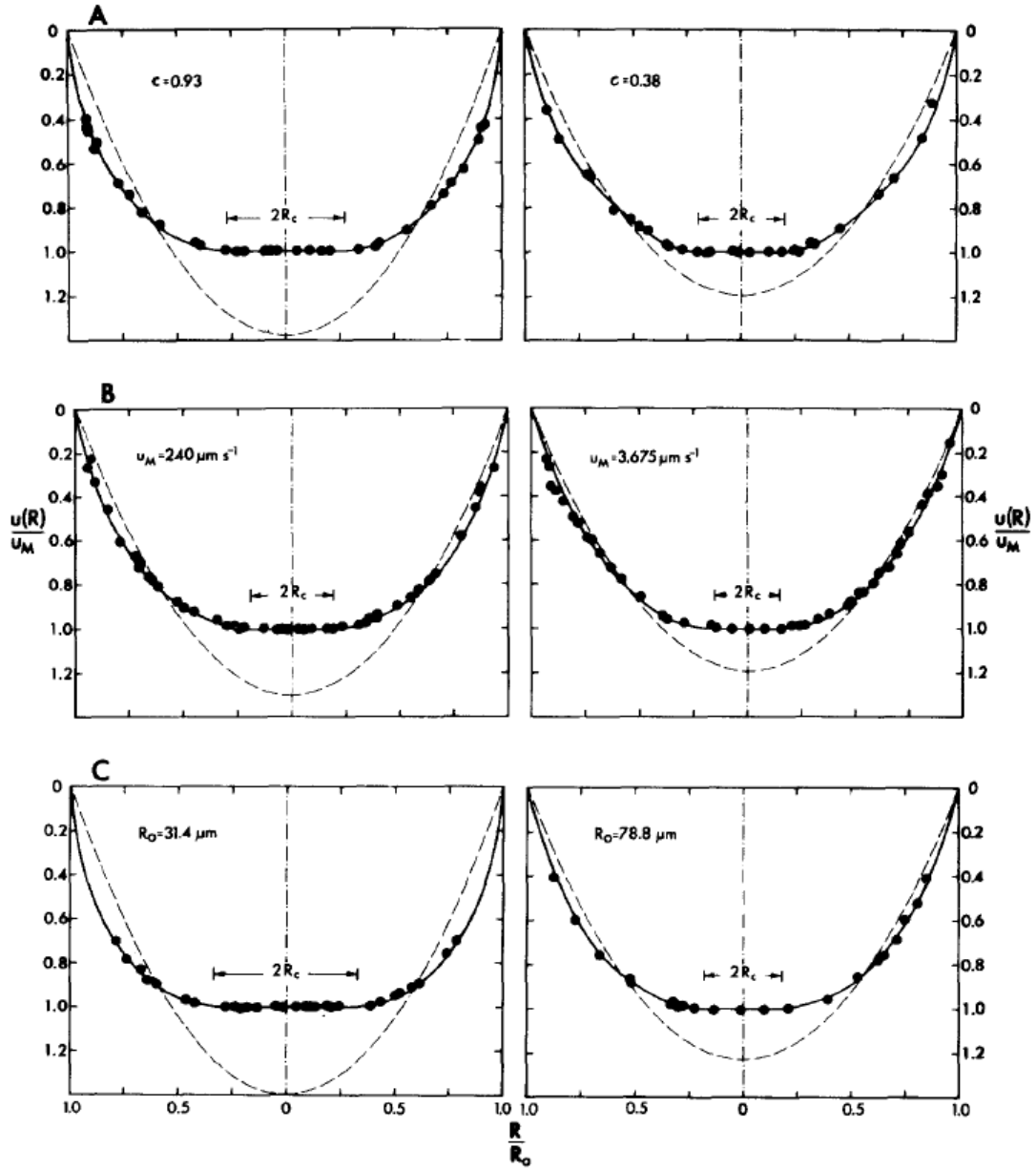


FIGURE 1.1.5: **Profils de vitesse de globules rouges** traceurs dans une suspension de globules rouges fantômes : Goldsmith and Marlow (1979), montrant les effets de (A) la concentration, (B) le débit, (C) le rayon du tube en verre. Les longueurs sont adimensionnées par le rayon du tube et les vitesses par la vitesse maximale des globules (u_M). Pour chaque cas, la ligne pointillée indique le profil de vitesse du fluide pour un écoulement de Poiseuille de même débit.

phase est une différence des hématocrites entre les trois branches d'une bifurcation, et plus généralement entre les différents segments d'un réseau microvasculaire. On peut trouver des branches perfusées seulement par du plasma, lorsque par exemple le diamètre de la branche fille est très petit par rapport à celui de la branche mère, ou si le débit y est très faible.

Différentes études de l'effet de séparation de phase ont été réalisées *in vivo* (e.g. Pries et al., 1989) ou *in vitro* (e.g. Ishikawa et al., 2011), pour des suspensions de globules rouges ou de particules sphériques (e.g. Ditchfield and Olbricht, 1996; Doyeux et al., 2011). Des simulations de ce phénomène ont aussi été proposées (e.g. El-Kareh and Secomb, 2000). Nous développerons ces différents travaux dans le Chapitre 5, dédié à l'effet de séparation de phase. Nous pouvons toutefois souligner que la compréhension de ce phénomène reste incomplète, c'est pourquoi nous nous intéressons plus particulièrement à ce phénomène.

Les paramètres importants qui définissent la distribution des débits de sang et de globules rouges aux bifurcations, ressortant de ces différentes études sont : la distribution des débits entre les branches de la bifurcation, le ratio entre le diamètre des vaisseaux et la taille des globules rouges, les ratios entre les diamètres des branches filles et de la branche mère, l'hématocrite moyen, et la façon dont sont répartis les globules rouges dans le vaisseau mère. En revanche, l'angle que forment les branches filles entre elles ne semble pas avoir d'effet sur la séparation de phase.

L'effet de séparation de phase est d'autant plus marqué que le diamètre des vaisseaux est petit, et il commence à être remarquable pour des diamètres de vaisseaux inférieurs à 30 μm (Pries et al., 1989).

D'un point de vue physiologique, l'effet de séparation de phase a des conséquences sur la composition du sang, sur l'hématocrite local et sa distribution dans le capillaire, et même sur l'agrégation. L'effet Fåhræus réseau, décrit ci-dessous, est aussi une conséquence de ce phénomène.

1.1.5.2 Effet Fåhræus réseau

Les segments d'un réseau microvasculaire où le débit est plus faible auront tendance à recevoir un hématocrite plus faible (Pries et al., 1992). Il en résulte une hétérogénéité de l'hématocrite pour des branches de même dimension et une corrélation entre la vitesse de l'écoulement et l'hématocrite. Ceci implique aussi que l'hématocrite de débit moyen dans un réseau capillaire sera inférieur à l'hématocrite de débit dans l'artériole mère.

1.1.5.3 Écoulement dans les réseaux microvasculaires : conclusion

L'écoulement dans un réseau microvasculaire est caractérisé par la grande hétérogénéité locale des hématocrites et des vitesses. D'après ce que nous venons de voir, parmi les paramètres définissant l'hémodynamique microvasculaire, nous trouvons : les caractéristiques géométriques du réseau, la relation entre le débit et la perte de charge (notion

de viscosité apparente), et l'effet de séparation de phase aux bifurcations.

1.1.6 Conclusion

Parmi les enjeux de l'étude de la microcirculation, nous pouvons citer : comprendre la physiologie microcirculatoire, comprendre les changements intervenants dans certaines pathologies, aider à la conception de médicaments, ou encore déchiffrer les mécanismes de croissance et de remodelage du réseau microvasculaire. Les différents travaux menés jusqu'ici ont amené de solides connaissances concernant la rhéologie du sang, c'est-à-dire sur la déformabilité des globules rouges, sur les caractéristiques de la couche d'exclusion plasmatique aux parois des microvaisseaux, sur les phénomènes d'agrégation et de sédimentation des globules rouges, et sur la viscosité du sang. Ces travaux ont permis aussi de comprendre les propriétés fonctionnelles des réseaux microvasculaires et les conséquences de l'hétérogénéité de l'architecture microvasculaire. Bien sûr, certains phénomènes restent partiellement ou complètement méconnus. Ainsi, l'importance de l'agrégation des globules rouges *in vivo*, en conditions normales ou pathologiques, est toujours débattue. Par ailleurs, les causes des différences trouvées entre la viscosité effective *in vivo* et *in vitro* ne sont pas encore bien établies. Même si la grande hétérogénéité de l'hémodynamique microvasculaire est bien démontrée, ses implications dans les fonctions de transport de masse sont peu connues. Enfin, les mécanismes de répartition des globules rouges aux bifurcations microvasculaires restent à clarifier.

Cette thèse s'inscrit dans une volonté de compréhension et de détermination quantitative de l'effet de séparation de phase aux micro-bifurcations. Les premiers microsystèmes fluidiques permettant de mimer la géométrie de petits vaisseaux isolés furent des tubes en verre (Fahraeus, 1929). Dans ces tubes, les études sont limitées à un unique canal dont le diamètre est généralement supérieur à 20 μm . Récemment, la microfluidique a montré son fort potentiel pour l'étude des écoulements dans des réseaux de vaisseaux de dimensions comparables à celles des capillaires, c'est ce que nous allons voir dans la section suivante.

1.2 La microfluidique : un moyen d'étude de la microcirculation

Les modèles *in vitro* de la microcirculation sont très intéressants pour comprendre des phénomènes qui ont lieu *in vivo*. De tels modèles permettent la maîtrise et la mesure précise des paramètres pertinents de l'écoulement et de s'affranchir des mécanismes de régulation microvasculaires. En effet, l'écoulement capillaire *in vivo* peut fluctuer de façon périodique Wayland and Johnson (1967), voire chaotique (Barclay et al., 2000), et des changements de la dynamique des écoulements microvasculaires peuvent apparaître en réaction à un contrôle expérimental de l'écoulement. Aujourd'hui, les modèles de

circulation *in vitro* à l'échelle microvasculaire apparaissent indispensables pour relever les défis expérimentaux.

1.2.1 Les microsystèmes en PDMS

Comme nous l'avons déjà souligné, les premiers micro-systèmes furent les tubes en verre de diamètre comparable à celui des artérioles et des veinules. Dans les années 1980, les micro-systèmes composés alors de plusieurs canaux, étaient fabriqués grâce aux technologies de photolithographie et de gravure sur silicium ou sur verre (McDonald et al., 2000). Cependant, le silicium est un matériau cher et opaque et le verre a l'avantage d'être transparent mais la lumière est réfractée au niveau des parois d'un micro-canal en verre, de plus le verre est plus difficile à graver que le silicium. Depuis le début des travaux de la microfluidique une rapide expansion des études utilisant de nouveaux types de matériaux, comme les polymères, a eu lieu. Ceux-ci sont bon marché et présentent de nombreux autres avantages. En particulier, le Poly(diméthylsiloxane) (PDMS) est maintenant largement utilisé pour la fabrication de systèmes micro-fluidiques (McDonald et al., 2000; McDonald and Whitesides, 2002). Pour l'étude *in vitro* des écoulements sanguins en micro-canaux, Lima et al. (2008) ont comparé l'usage de micro-canaux en verre ou en PDMS. Pour cette application, le PDMS présente de nombreux intérêts :

- c'est un élastomère bio-compatible qui permet de très bien mimer la géométrie des vaisseaux sanguins,
- le PDMS est transparent optiquement et, à la différence du verre, la réfraction aux parois des micro-canaux est très limitée,
- un système en PDMS est facile à répliquer, même pour des réseaux complexes,
- la technique de fabrication de micro-systèmes en PDMS est simple et bon marché.

Associés aux microscopes et caméras rapides de dernières générations, les modèles de microcirculation en PDMS permettent d'avoir de très bonnes conditions d'acquisition d'images des écoulements, comme en attestent les photographies de la figure 1.2.1.

1.2.2 Modèles *in vitro* de la microcirculation

Un réseau de micro-canaux en PDMS, représentant la microcirculation, a été développé par Shevkoplyas et al. (2003). Ils ont réalisé un réseau plan de 34 micro-canaux d'une profondeur constante de 5,4 μm et d'une largeur allant de 6 à 63 μm ; le schéma du réseau est présenté sur la figure 1.2.1. L'écoulement dans ce réseau, qui possède une seule entrée et une seule sortie, est engendré par gravité. Ce travail fournit des données qualitatives sur les écoulements de globules rouges et de globules blancs dans un réseau de ce type, et a notamment permis de montrer que la forme des globules dans ces canaux à section rectangulaire est similaire aux formes observées *in vivo* dans des vaisseaux capillaires. Cependant, ce dispositif ne permet pas de maîtriser le débit dans chaque segment, car celui-ci va dépendre de l'interaction entre l'architecture du réseau et les propriétés rhéologiques de la suspension.

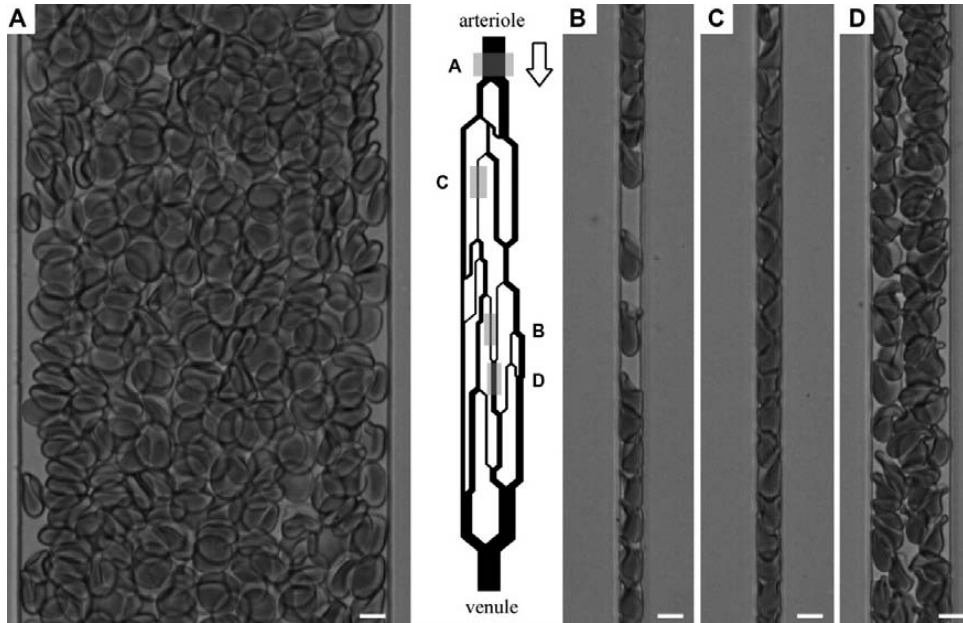


FIGURE 1.2.1: **Globules rouges circulant dans un microsystème en PDMS** schématisé au centre de la figure, d'après Burns et al. (2012). Les canaux ont tous une profondeur de $5\ \mu\text{m}$, la barre d'échelle représente $5\ \mu\text{m}$ sur les images. L'écoulement a lieu du haut vers le bas sur les images. (A) Globules rouges dans un canal large ($70\ \mu\text{m}$) : les globules sont peu déformés au centre du canal, ils se déforment principalement près des parois, à cause du taux de cisaillement, et lors de collisions entre globules. (B) Dans un petit capillaire de $5\ \mu\text{m}$: les globules rouges se déforment et apparaissent en forme de « parachute ». (C) Le même petit capillaire pour un hémocrite plus élevé : les globules se déforment et circulent à la file. (D) Écoulement multi-file de globules rouges dans un plus grand capillaire ($13\ \mu\text{m}$) recevant, en amont, les globules de deux capillaires convergents.

Les modèles *in vitro* de la microcirculation ont par la suite trouvé diverses applications. Par exemple, Shelby et al. (2003) ont montré le potentiel des micro-canaux en PDMS pour caractériser le comportement complexe de globules rouges individuels, infectés ou non par la malaria, sous un écoulement similaire aux écoulements capillaires *in vivo*. Les réseaux de micro-canaux sont aussi un très bon outil pour analyser la déformabilité des globules rouges (Burns et al., 2012 et figure 1.2.1) ou encore pour étudier la répartition du débit sanguin au niveau de micro-bifurcations (Ishikawa et al., 2011). A notre connaissance aucun dispositif microfluidique n'a encore permis d'étudier quantitativement les écoulements au niveau de micro-bifurcations pour des canaux de l'ordre de 20 μm ou moins, les tailles pour lesquelles l'effet de séparation de phase commence à être marqué.

En vue de quantifier les paramètres de l'écoulement de globules rouges dans notre dispositif microfluidique, la section suivante présente des méthodes de mesures compatibles avec notre étude. L'objectif est de déterminer les méthodes qui seront les mieux adaptées à la mesure des vitesses et des hématocrites pour des écoulements de suspensions concentrées de globules rouges dans des micro-canaux de 10 à 100 μm de côté.

1.3 La microcirculation : les méthodes d'exploration

Comprendre et quantifier les écoulements dans la microcirculation passe par la mesure des vitesses des globules rouges et du plasma, et par la mesure d'hématocrite ou par la mesure directe des débits. A ces fins, différentes méthodes ont été développées pour des mesures *in vivo* et/ou *in vitro*. Certaines techniques, dont le principe est largement utilisé pour des situations autres que la microcirculation (comme l'effet Doppler, la PIV), ont été adaptées pour des mesures dans les conditions particulières de la microcirculation (petits diamètres, suspensions concentrées). D'autres techniques (comme la *dual-slit*) ont été développées spécifiquement dans le but de quantifier l'écoulement dans la microcirculation.

La principale difficulté des mesures dans la microcirculation est que la résolution des dispositifs de mesure est du même ordre de grandeur que l'échelle de l'écoulement. En particulier, la présence d'un gradient de vitesse à l'échelle de la mesure complique l'exploitation des résultats.

Les techniques décrites ci-dessous visent à mesurer des vitesses et des hématocrites de micro-écoulements sanguins. Pour déterminer le débit sanguin dans un vaisseau, la connaissance des distributions de vitesse et d'hématocrite, et celle de la section du vaisseau sont nécessaires. En conséquence, des incertitudes sur l'un ou plusieurs de ces paramètres peuvent amener à de grandes imprécisions sur la mesure du débit sanguin. C'est ce qu'ont montré Cokelet et al. (1998), en quantifiant les déviations à la conservation de la masse du débit sanguin, et de l'hématocrite de débit mesurés *in vivo* par des méthodes photométriques. Ils constatent que, très souvent, ces déviations sont importantes. Les erreurs de mesures peuvent avoir des sources variées. Ces incertitudes dépendent des

méthodes employées pour déterminer les différents paramètres de l'écoulement, de la précision des dispositifs expérimentaux ou encore du type de vaisseau à l'étude. Quoiqu'il en soit, il conviendra donc de s'affranchir autant que possible d'accumuler des imprécisions de mesures, qui conduiraient à de grandes erreurs sur la détermination du débit sanguin.

1.3.1 Mesures de vitesses

1.3.1.1 Laser Doppler

La vélocimétrie laser Doppler est basée, comme son nom l'indique, sur l'effet Doppler. Lorsqu'un faisceau laser incident rencontre un globule rouge mobile, il est réfléchi avec une modification de longueur d'onde proportionnelle à la vitesse du globule rencontré. Dans les années 60, Cummins et al. ont proposé d'utiliser un spectromètre laser, développé au préalable pour l'étude moléculaire de polymères et de colloïdes, pour mesurer la vitesse d'un fluide. Ils ont évalué le profil de vitesse d'une suspension colloïdale, diluée, dans un tube de grand diamètre. La technique a ensuite été appliquée par Riva et al. (1972) aux écoulements sanguins dans un tube de 200 μm de diamètre. Ils ont montré alors que la fréquence remarquable du signal reçu et le débit sanguin varient linéairement. Puis, la vélocimétrie laser pour la mesure du débit sanguin cutané a été développée par les travaux de Holloway and Watkins (1977); Stern (1975); Watkins and Holloway (1978). Cette technique a l'avantage d'être non invasive. Par contre, une calibration est nécessaire : on ne mesure pas directement la vitesse de l'écoulement, mais un signal proportionnel à celle-ci. De plus, *in vivo*, la région d'analyse n'est pas limitée à un vaisseau mais à plusieurs vaisseaux adjacents ; des vitesses variées de cellules peuvent donc perturber la mesure. La mesure de l'écoulement sanguin par laser Doppler est assez utilisée *in vivo* (Riva, 2001; Choi and Bennett, 2003; Humeau et al., 2007; Keymel et al., 2010), cette technique est intéressante pour évaluer des fluctuations de l'écoulement, mais n'a pas été appliquée, à notre connaissance, à l'échelle d'un capillaire individuel. Golster et al. (1999) ont appliqué la technique à des vaisseaux uniques, mais dont les diamètres sont supérieurs à 40 μm .

1.3.1.2 Interférométrie par rétroinjection optique

L'interférométrie par rétroinjection optique (OFI, Optical Feedback Interferometer), utilisant le phénomène de *self-mixing*, est une technique de mesure pour laquelle un faisceau laser est réfléchi par un objet, puis renvoyé dans la cavité du laser. La lumière réfléchie interfère alors avec la lumière à l'intérieur du laser, provoquant des changements de propriétés optiques et électriques du laser. Des informations sur l'objet sont obtenues par l'analyse de ces changements de propriétés. La technique de *self-mixing* par diode laser est couramment utilisée pour des mesures de vibrations, de déplacements ou de vitesses d'objets (Giuliani et al., 2002). L'effet de *self-mixing* a été appliqué à la mesure d'écoulements sanguins dans un large tube en verre de 10 mm de diamètre par Koelink

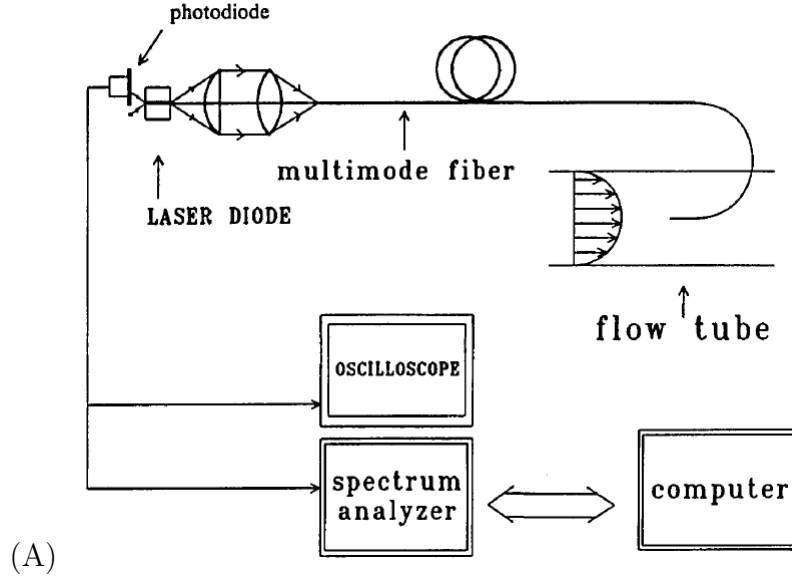
et al. (1994). Le principal inconvénient de ce dispositif expérimental est que le capteur est placé dans le tube, voir figure 1.3.1. La mesure est donc invasive et crée des perturbations de l'écoulement autour du capteur. Par ailleurs, comme dans le cas de la technique de vélocimétrie laser, une calibration de la mesure est nécessaire. Néanmoins, l'étude de Koelink et al. (1994) a montré l'existence d'une relation linéaire entre le débit de l'écoulement et le spectre de premier ordre du signal, déterminé après traitement du signal de *self-mixing*. Grâce au progrès technologique, l'OFI (Bosch T, 2006) est ensuite apparue comme un moyen rapide, direct, et non-invasif pour déterminer la vitesse de l'écoulement dans des canaux (voir le montage expérimental en figure 1.3.1, B). Cette technique permet une visualisation du signal en temps réel et l'obtention d'informations sur la taille et la concentration des particules. Très récemment, des travaux ont été menés par Campagnolo et al. (2012), pour appliquer l'OFI aux micro-écoulements. La technique a été validée pour des écoulements de suspensions colloïdales formées d'eau et de lait dans des canaux de 320 μm de diamètre (Campagnolo et al., 2012), puis dans un canal à section rectangulaire de 20 μm \times 100 μm (Campagnolo et al., 2012). Ces derniers résultats, et la perspective d'une application de l'OFI aux écoulements sanguins, sont présentés en annexe D.

1.3.1.3 Corrélation spatiale : PIV, PTV

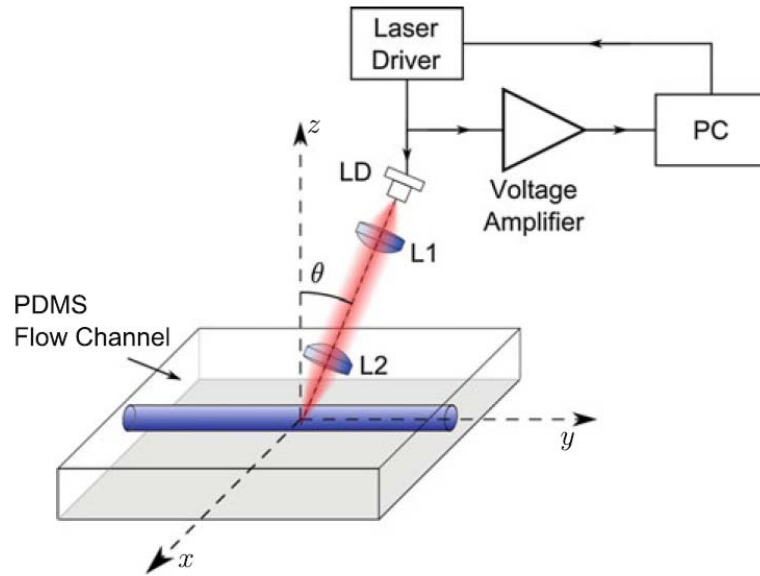
Particle Image Velocimetry (PIV, micro-PIV)

PIV

La PIV permet la mesure simultanée des vecteurs vitesses d'un fluide pour un très grand nombre de points (Adrian, 2005). Cette technique apparaît en 1984 (Adrian; Pickering and Halliwell). Elle trouve ses racines dans la vélocimétrie par «speckle laser», décrite pour mesurer des profils de vitesse dans des tubes en écoulement laminaire (Barker and Fourney, 1977; Grousson and Mallick, 1977; Dudderar and Simpkins, 1977). Le principe de la PIV est d'ensemencer un fluide avec des particules traceurs, assez petites pour suivre la dynamique de l'écoulement sans le perturber. Ces particules sont illuminées, généralement par un laser, pour les rendre visibles. Des paires d'images de l'écoulement, séparées d'un intervalle de temps Δt , sont enregistrées. Des fenêtres d'interrogation (zones rectangulaires où se trouvent plusieurs particules fluorescentes) sont sélectionnées. Le déplacement Δl d'une fenêtre d'interrogation entre deux images est déterminé à l'aide d'algorithmes d'intercorrélation. Lorsque la corrélation spatiale, entre une fenêtre de la première image et une fenêtre de la seconde image, atteint son maximum, on obtient le déplacement de la zone d'interrogation. La vitesse obtenue est alors donnée par $|\Delta l|/\Delta t$ (Raffel et al., 2007). Ces 30 dernières années, la PIV a été très largement développée pour des applications variées. Pour illuminer les traceurs, une nappe laser de faible épaisseur (environ 1 mm) est habituellement utilisée. Seules les particules présentes dans cette nappe sont visualisées. Cependant, l'utilisation d'une nappe laser se révèle problématique pour des dimensions inférieures au millimètre. La PIV a donc



(A)



(B)

FIGURE 1.3.1: **Techniques utilisant l'effet de self-mixing** pour des mesures de vitesses d'écoulement dans des canaux. (A) dispositif invasif de Koelink et al. (1994) dans un canal de 10 mm de diamètre, (B) dispositif non-invasif d'OFI (Optical Feedback Interferometer) de Campagnolo et al. (2012) pour un canal plus petit (320 μm de diamètre).

été adaptée pour les micro-écoulements : on parle alors de micro-PIV.

Micro-PIV confocale

Dans le cas de micro-écoulements *in vitro*, la PIV est associée à la microscopie confocale, et donc à la possibilité de réaliser des images à faible profondeur de champs (Tannaami et al., 2002; Park et al., 2004). Un dispositif expérimental de micro-PIV confocale comprend typiquement : un microscope confocal, une diode laser pour exciter les particules fluorescentes et une caméra rapide montée sur le microscope. Appliqué aux écoulements sanguins *in vitro*, ce dispositif a permis d'obtenir des profils de vitesse 2D, voire 3D, de particules ensemencées dans une suspension de globules rouges (Sugii et al., 2005; Lima et al., 2006, 2007, 2008; Fujiwara et al., 2009). Lima et al. (2006) suivent l'écoulement dans un canal de section carrée ($100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$) grâce à des microsphères fluorescentes de $1\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre, dispersées dans de l'eau, puis dans une suspension de globules rouges à 10% en volume. Dans une étude similaire, Sugii et al. (2005) ajoutent jusqu'à 20% de globules rouges. Dans ces travaux les profils de vitesse obtenus par micro-PIV confocale pour la solution d'eau sont comparés aux profils théoriques pour un fluide newtonien, et montrent que les erreurs de mesure sont inférieures à 3%. La résolution spatiale sur les vecteurs vitesses instantanées varie typiquement de $15 \times 10\text{ }\mu\text{m}^2$ (Lima et al., 2006, voir figure 1.3.2, a) à $9 \times 2,3\text{ }\mu\text{m}^2$ (Sugii et al., 2005), l'espacement entre deux images étant respectivement de 5 ms et 0,16 ms. La moyenne des vitesses instantanées sur la longueur du canal, amène au profil transversal de vitesse, cf figure 1.3.2, b.

Par ailleurs, la micro-PIV confocale a la capacité d'acquérir des images dans une tranche optique (tous les $15\text{ }\mu\text{m}$ dans la profondeur du canal pour Lima et al., 2006) et a donc la possibilité de reconstruire des profils 3D en analysant des tranches optiques à différentes profondeurs dans le canal.

Cependant, même dans le cas d'une suspension diluée de globules rouges (cf figure 1.3.3), la présence de globules perturbe la mesure PIV (Lima et al., 2006), il devient alors nécessaire de prendre plus de paires d'images pour corrélérer les fenêtres d'interrogations (100 paires espacées de 5 ms contre 20 paires pour un écoulement de particules dans de l'eau). Ces perturbations de la mesure observées quand l'hématocrite augmente, sont associées aux mouvements et aux interactions des globules rouges, ainsi qu'à la lumière qu'ils absorbent et diffusent (Lima et al., 2007).

Micro-PIV confocale : conclusion

La micro-PIV confocale montre la capacité à fournir des images, et donc des mesures de haute résolution et des mesures de vitesses en 3D, par tranches optiques. Cependant, la technique nécessite de suivre le déplacement de particules traceurs exogènes et donc d'ensemencer le fluide à étudier. Ceci représente un réel inconvénient pour une application *in vivo* ou dans le cas d'un fluide concentré en globules rouges. En effet, en

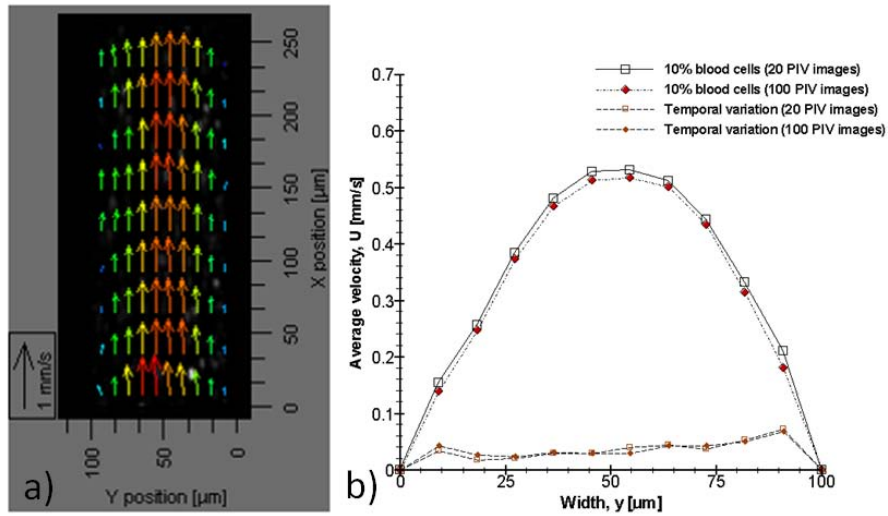


FIGURE 1.3.2: **Champs et profils de vitesse obtenus par micro-PIV** sur des particules dispersées dans une suspension de 10% de globules rouges dans un micro-canal à section carrée, d'après Lima et al. (2006). a) Vitesses instantanées pour une paire d'images PIV espacées de 5 ms, b) Profil de vitesse PIV.

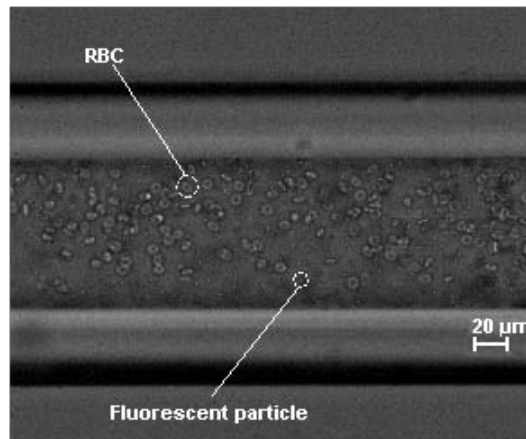


FIGURE 1.3.3: **Écoulement d'une suspension de globules rouges dans un micro-canal** en verre de section $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, photo de Lima et al. (2006). L'hématocrite est de 10%, l'écoulement estensemencé de particules fluorescentes (petits points sur l'image) pour les mesures de micro-PIV.

présence de globules rouges, la mesure est perturbée, de plus, on peut imaginer que les globules rouges entraînent avec eux les particules, et donc rien ne prouve que ces particules suivent uniquement l'écoulement du plasma, comme c'est généralement supposé. Par ailleurs, la méthode nécessite de fixer beaucoup de paramètres dont les résultats de la mesure vont dépendre : la taille des fenêtres d'interrogation, le décalage temporel entre deux images, ou encore le seuil pour valider la corrélation.

Une autre limitation, mise en évidence par Sugii et al. (2005), est le bruit de fond dans les images, dû aux particules qui sont en dehors de la tranche optique de mise au point du microscope. Ces particules peuvent perturber la mesure, notamment à cause des gradients de vitesses qui existent dans le canal. Pour palier ce problème, Lima et al. (2006) utilisent un microscope confocal à disque rotatif : le canal est alors illuminé à un moment donné et seulement dans le plan de mise au point par de tout petits spots. Ce système permet de limiter au maximum la lumière émise par les particules en dehors de la zone de mise au point.

A notre connaissance, la micro-PIV n'a pas été appliquée en utilisant directement les globules rouges comme traceurs. Les informations obtenues concernent donc seulement des particules exogènes. Par ailleurs, le coût du matériel nécessaire à la micro-PIV est élevé. Finalement, la micro-PIV est bien adaptée pour mesurer la vitesse de particules traceurs dispersées dans des vaisseaux de diamètre assez grand ($\sim 100\mu\text{m}$) et pour un hématoците pas trop important ($< 20\%$).

Particle Tracking Velocimetry (PTV)

PTV

La PTV est une méthode de mesure de la vitesse de particules. Elle se différencie de la PIV qui mesure la vitesse de groupes de particules. À partir de séquences d'images de l'écoulement, les particules sont suivies de façon individuelle sur plusieurs images. Pour suivre sans difficulté une particule, la suspension doit être très diluée pour pouvoir individualiser les particules et éviter leurs interactions. Toute la difficulté se trouve dans l'identification et l'appariement de chaque particule, d'une image à l'autre. Des techniques de traitement d'images et de corrélation spatiale permettent d'obtenir le déplacement d'une particule. En général, plusieurs couples d'images sont considérés et une étude statistique est réalisée sur les vecteurs vitesse obtenus pour chaque particule.

Tout comme la micro-PIV, qui associe PIV et microscopie confocale, la micro-PTV désigne l'association de la microscopie et de la PTV afin d'étudier des micro-écoulements.

Micro-PTV confocale

Le déplacement de globules rouges individuels, dans des microtubes en verre de 30 à 80 μm de diamètre, et pour de grands hématoцитes (jusqu'à 93% v/v), a été étudié par Goldsmith and Marlow (1979). Pour ce faire, ils suivent les globules rouges dans une suspension de globules rouges fantômes. Les globules fantômes sont des globules rouges

qui ont été lysés, ils forment donc une solution transparente qui transmet la lumière. Quelques globules rouges traceurs sont ajoutés à cette suspension fantôme. Leur forme, leur orientation et leur déplacement sont donc identifiables. Les profils de vitesse de globules rouges, décrits par Goldsmith and Marlow (1979) ont été présentés dans la Section 1.1.4, figure 1.1.5. Même si l'approche de Goldsmith and Marlow (1979) pour mesurer des profils de vitesse de globules rouges en suspension concentrée est séduisante, elle pose le problème de la fabrication des globules rouges fantômes qui joue fortement sur les propriétés mécaniques de la membrane des globules rouges. La dynamique de l'écoulement de ces suspensions peut donc être très différente de la dynamique de suspensions réelles de globules rouges.

Pour des suspensions de globules rouges *in vitro*, en conditions physiologiques, la micro-PTV est aussi utilisée en marquant par fluorescence une petite quantité de globules rouges circulant dans une suspension concentrée (jusqu'à 35% v/v) (Lima et al., 2008, 2009), pour des diamètres de tubes de 50 μm et 100 μm . Le principal inconvénient des suspensions concentrées est qu'elles atténuent fortement la lumière incidente. Malgré le progrès technologique constitué par le dispositif expérimental utilisé par Lima et al. (2009), qui est le même que celui décrit ci-dessus pour la micro-PIV (Lima et al., 2007), un temps d'exposition long (9,4 ms) est nécessaire dès que l'hématocrite dépasse 9%. En effet, la quantité de lumière absorbée et diffusée par les globules rouges devient importante à ces concentrations. Cela limite donc Lima et al. (2009) à de faibles résolutions temporelles (100 images/s) pour avoir des images de qualité suffisante pour l'analyse par micro-PTV.

Par ailleurs, la micro-PTV est rarement appliquée pour obtenir des profils de vitesse des globules rouges mais sert plutôt à étudier la trajectoire de globules rouges individuels, afin d'évaluer leur dispersion radiale (Lima et al., 2008, 2009; Fujiwara et al., 2009). Sugii et al. (2005) appliquent la micro-PTV à la mesure du profil de vitesse des globules rouges, mais aucun point expérimental n'est obtenu à moins de 20 μm des parois du canal qui fait 100 μm de large. Les raisons de ce manque de mesures au niveau des parois ne sont pas claires. Il semble que la précision de la mesure diminue quand l'hématocrite ou la vitesse diminuent. La micro-PTV a aussi été utilisée par Long et al. (2004) pour la mesure de profils de vitesse. Dans cette étude, comme en micro-PIV, des micro-particules sont dispersées dans une suspension de globules rouges, puis leur déplacement et leur vitesse sont mesurés. L'hématocrite des suspensions peut alors varier de 0 à 60%, et pour des diamètres de tube allant de 40 μm à 80 μm , les profils de vitesse de ces particules exogènes sont obtenus.

Micro-PTV : conclusion

Pour mesurer la vitesse de globules rouges, la micro-PTV est efficace pour des suspensions très diluées, où les globules rouges n'interagissent pas entre eux. Même dans ce cas, les globules rouges ne vont pas à la même vitesse selon la profondeur à laquelle ils se trouvent dans le canal. Il convient donc d'en tenir compte, en ayant, par exemple, une

faible profondeur de champ du microscope (environ égale à la taille d'un globule), pour suivre les globules rouges se trouvant dans une fine tranche optique. L'idée de suivre une petite quantité de globules rouges traceurs, circulants dans une suspension concentrée, apparaît pertinente pour étudier l'écoulement en conditions physiologiques. Toutefois, on est limité en concentration par les autres globules qui atténuent la lumière, et qui vont déformer, ou cacher les globules traceurs. De plus, il faut qu'il y ait assez de globules rouges traceurs distribués dans tout le canal, et pas seulement présents au centre, pour obtenir un profil de vitesse.

Les techniques de corrélation spatiale ne se montrent pas adaptées pour mesurer des vitesses pour des suspensions concentrées de globules rouges. Une alternative est l'utilisation d'une technique de corrélation temporelle : la *dual-slit*.

1.3.1.4 Corrélation temporelle : *dual-slit*

La *dual-slit* est une technique de corrélation temporelle, introduite par Wayland and Johnson (1967). Elle est couramment utilisée pour mesurer la vitesse des globules rouges dans la microcirculation. La technique de *dual-slit* consiste à placer deux capteurs optiques (les *slits*) séparés d'une distance L_s le long de l'axe d'un vaisseau éclairé. Ces *slits* vont enregistrer les variations temporelles de la lumière qui sont dues au passage des globules rouges par les *slits*. Les *slits* peuvent être des régions d'intérêts des images de l'écoulement, des photodiodes ou encore des fibres optiques. Un signal temporel est obtenu pour chaque *slit*. La vitesse $V_{ds} = L_s/T_{max}$ est obtenue, où T_{max} est le décalage temporel pour lequel l'intercorrélation entre les deux signaux est maximale. Un schéma du dispositif expérimental classique en *dual-slit* est présente en figure 1.3.4.

La *dual-slit* a été initialement appliquée par Wayland and Johnson (1967) à de petits capillaires où des globules rouges ou des trains de globules rouges circulent à la file indienne, tous à la même vitesse. C'est cette vitesse qui est alors directement mesurée par corrélation. Puis la technique a été étendue à des vaisseaux plus larges (Gaetgens et al., 1969, 1970b; Wayland, 1973; Baker and Wayland, 1974; Silva and Intaglietta, 1974; Lee et al., 1983; Pittman and Ellsworth, 1986; Lee and Duling, 1989; Sapuppo et al., 2007). Dans ces larges vaisseaux, les globules rouges sont positionnés à des profondeurs différentes dans le canal et y circulent à des vitesses différentes. Par conséquent, les globules rouges positionnés à différentes profondeurs dans le canal ne participent pas de la même façon à la modulation du signal reçu par les deux *slits* (pour plus de détails cf. 3.1). La signification physique de la vitesse mesurée V_{ds} n'est donc pas évidente.

Quoiqu'il en soit, la *dual-slit* est toujours d'actualité pour dans les études de la microcirculation sanguine, *in vitro* (Sakai et al., 2009), ou *in vivo* (Villela et al., 2009; Ong et al., 2010; Salazar Vazquez et al., 2010).

Comparée aux techniques de corrélation spatiale décrites ci-dessus, la *dual-slit* présente l'avantage de pouvoir être appliquée à des écoulements sanguins de concentration importante. Effectivement, dans le cas de la *dual-slit*, l'intercorrélation de deux signaux

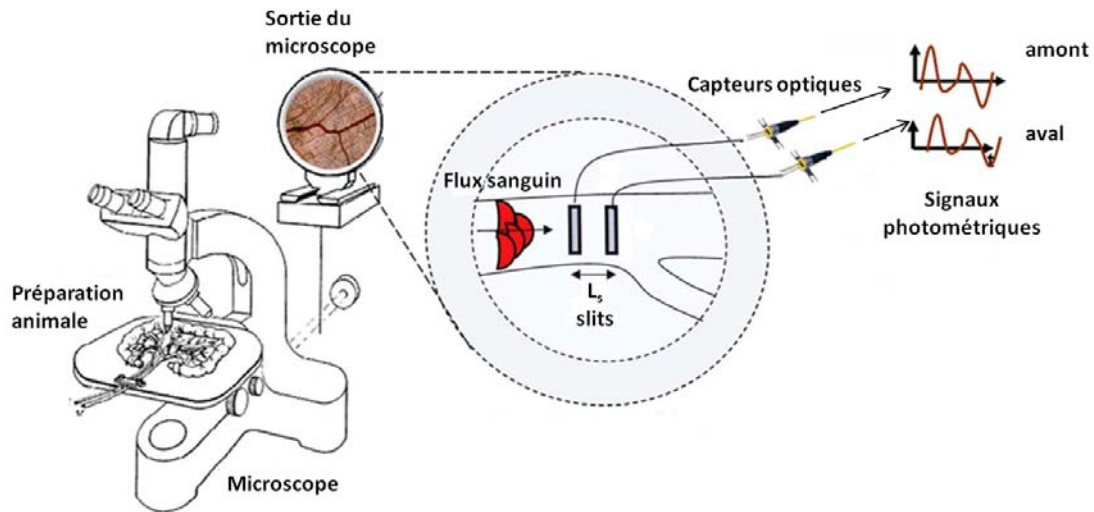


FIGURE 1.3.4: **Dispositif expérimental de *dual-slit*, d'après Sapuppo et al. (2007).** Le vaisseau à l'étude est placé sous le microscope, deux photo-capteurs, les *slits*, espacés d'une distance L_s le long du vaisseau, enregistrent les fluctuations temporelles de lumière, dues au passage des globules rouges.

temporels est réalisée, à la différence de la micro-PTV ou la micro-PIV qui nécessitent la reconnaissance de traceurs ou groupes de traceurs individuels dans l'écoulement.

La *dual-slit* apparaît comme une technique intéressante, économique, et facile à mettre en œuvre pour des mesures de vitesses de globules rouges dans des microvaisseaux en conditions physiologiques. Néanmoins, il reste à élucider la relation entre la vitesse déterminée par *dual-slit* et les vitesses caractéristiques de l'écoulement (vitesse maximale, vitesse moyenne, etc.). Ceci sera l'objet de la section 3.1, où nous reviendrons sur les différents travaux qui ont visé à établir une relation entre la vitesse mesurée par *dual-slit* et la vitesse moyenne de l'écoulement. Nous discuterons aussi des travaux qui ont souligné l'importance de paramètres comme la distance entre les *slits* ou la taille des *slits*. Notre but est de clarifier la signification physique de la vitesse mesurée par *dual-slit*.

1.3.1.5 Conclusion

Pour des mesures de vitesses de globules rouges dans des microvaisseaux en conditions d'écoulement physiologique, et donc pour des hématocrites pouvant être conséquents, c'est la *dual-slit* qui semble avoir le meilleur potentiel. Elle est d'ailleurs très largement utilisée. Toutefois, les problèmes liés à la présence de gradients de vitesse à l'échelle de la mesure ne sont résolus pour aucune de ces techniques. Pour cette raison, nous nous sommes plus particulièrement penchés sur la technique de *dual-slit* (cf. section 3.1) et sur l'influence des gradients de vitesse sur la mesure. Dans des cas d'écoulements de suspensions diluées, le suivi de globules rouges individuels (PTV) est aussi un bon moyen d'obtenir leur profil de vitesse.

1.3.2 Mesure de l'hématocrite

La mesure du débit sanguin à partir des profils de vitesse des globules rouges nécessite de connaître l'hématocrite de tube dans le vaisseau (H_t). Une technique classique pour déterminer H_t est de collecter, dans un tube à hématocrite, le sang ayant circulé dans un volume connu de vaisseau ou de canal. Ce tube est centrifugé, puis le rapport entre la hauteur de globules rouges et la hauteur totale de fluide dans le tube détermine le rapport entre le volume de globules et le volume total de sang. Cependant, en conditions expérimentales il est compliqué de récupérer le sang circulant dans une longueur donnée de vaisseau. De plus, cela met fin à l'expérience en cours. Il est également exclu de mesurer des fluctuations de l'hématocrite avec cette technique. Pour ces raisons, nous choisissons d'utiliser plutôt le signal provenant de séquences d'images de l'écoulement. Différentes techniques de mesure de l'hématocrite, présentées ci-dessous, existent alors.

1.3.2.1 Mesure de l'hématocrite par comptage

A partir de séquences d'images d'écoulements sanguins dans un vaisseau où les globules rouges sont individualisables et en connaissant les dimensions du vaisseau, H_t peut être obtenu simplement par : $H_t = \frac{N \times \mathcal{V}_{GR}}{\mathcal{V}}$, où N est le nombre moyen de globules rouges comptés dans un volume \mathcal{V} du vaisseau et \mathcal{V}_{GR} le volume d'un globule. Le nombre de globules rouges peut être déterminé manuellement ou de manière automatisée grâce à des méthodes de traitement d'images.

1.3.2.2 Mesure de l'hématocrite à partir de paramètres dynamiques de l'écoulement

Dans les capillaires assez petits pour que les globules rouges circulent à la file, H_t peut être calculé à partir de la vitesse des globules rouges (V_{GR}) et du débit de globules rouges. Dans ces vaisseaux, Johnson et al. (1973) mesurent le nombre de globules rouges par unité de longueur : $\frac{f_{GR}}{V_{GR}}$, où f_{GR} est le nombre de globules rouges qui passent à travers une section du vaisseau par unité de temps. Ce rapport, indicateur de l'hématocrite dans un capillaire, peut ensuite être reliée à H_t par :

$$H_t = \frac{f_{GR} \times \mathcal{V}_{GR}}{V_{GR} \times \pi r^2}, \text{ où } \pi r^2 \text{ est la section du vaisseau.}$$

Cette formulation est surtout utilisée dans les études physiologiques où f_{GR} et V_{GR} sont obtenus à partir de visualisations d'écoulements sanguins *in vivo* en microscopie à fluorescence (Braun et al., 2002; Schaffer et al., 2006; Nishimura et al., 2010), ou en microscopie intravitale (Desjardins and Duling, 1987; Constantinescu et al., 2001).

Cette technique de détermination de l'hématocrite est bien adaptée pour des capillaires où les globules circulent en file indienne. Il faut également être capable de déterminer la

vitesse des globules et le nombre de globules circulant par unité de temps. Ceci implique généralement d'être dans des conditions où les globules rouges sont reconnaissables individuellement, et donc pas trop concentrés. Dans le cas contraire, une alternative pour mesurer H_t est de relier une mesure de l'atténuation de la lumière à la concentration dans le vaisseau. C'est cette technique que nous présentons dans ce qui suit.

1.3.2.3 Mesure de l'hématocrite à partir de la densité optique

La densité optique (DO) est la propriété d'un échantillon à diminuer l'intensité d'un faisceau lumineux qui le traverse. Elle est définie par :

$$DO = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = DO_{abs} + DO_{diff}. \quad (1.3.1)$$

I_0 est l'intensité du faisceau incident et I l'intensité du faisceau transmis. Il s'agit alors de déterminer une relation entre DO et H_t . Plusieurs études ont été menées dans ce but, à l'aide d'une mesure de référence de H_t obtenue par centrifugation de la suspension de globules rouges contenue dans un capillaire en verre. Jendrucko and Lee (1973) ont ainsi montré que la DO varie non linéairement avec H_t et qu'elle ne dépend ni de la pression partielle d'oxygène ni de la vitesse des globules rouges. Ils ont établi une relation empirique entre la DO et H_t pour des tubes en verre de différents diamètres. Ces résultats ont été repris par Lipowsky et al. (1980), dans le but d'étudier l'influence sur les mesures de DO de la diffusion et de l'absorption de la lumière dans de petits capillaires en verre. Pour une suspension de globules rouges, la DO mesurée peut s'exprimer comme la somme de la DO due à l'absorption (DO_{abs}) et de la DO due à la diffusion (DO_{diff}) de la lumière incidente (cf. équation 1.3.1). La DO_{abs} est obtenue par Lipowsky et al. (1980) en effectuant des mesures sur des solutions d'hémoglobine qui suivraient la loi d'extinction de Beer-Lambert. Lipowsky et al. (1980) ont évalué DO_{diff} pour différentes valeurs de H_t et D , par soustraction de la DO totale mesurée pour des suspensions de globules rouges et de la DO_{abs} mesurée sur des solutions d'hémoglobine, voir figure 1.3.5. Il apparaît que pour des diamètres de tubes de 40 à 70 μm et lorsque $H_t < 30\%$, le terme de diffusion domine la mesure de la DO totale. Pour $30\% < H_t < 80\%$, c'est au contraire le terme d'absorption qui domine.

Une loi empirique a été déduite de ces mesures (Lipowsky et al., 1980), mais les paramètres qu'elle met en jeu sont difficiles à déterminer. Ils font notamment intervenir le volume des globules rouges, les indices de réfraction de l'hémoglobine et du milieu, et les caractéristiques du photodétecteur.

Un peu plus tard, une procédure complexe de calibration de la mesure de l'hématocrite par mesure de DO a été proposée par Pries et al. (1983). Ils ont mis notamment en évidence que la DO d'une solution d'hémoglobine et la DO_{abs} d'une suspension de globules rouges de même concentration en hémoglobine ne sont pas égales. Il y a toujours une partie de la lumière qui est transmise sans être absorbée par passage à travers les particules. De plus, Pries et al. (1983) mettent en évidence que les choix de la longueur

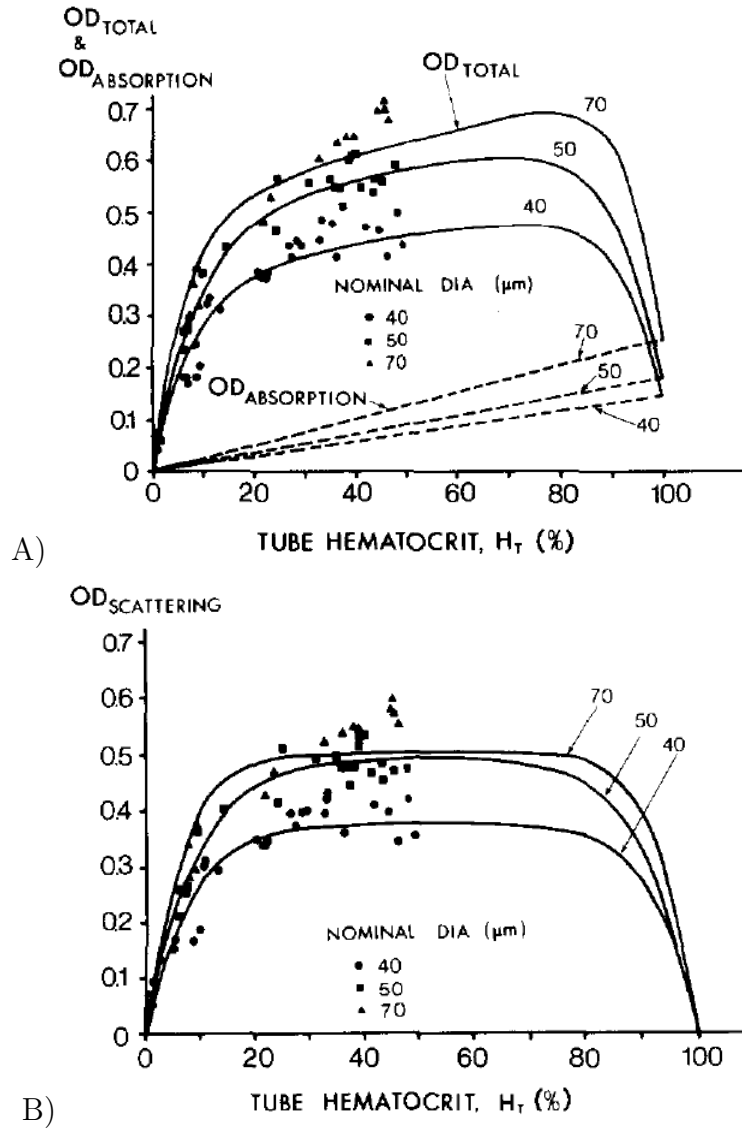


FIGURE 1.3.5: Mesures de densité optique en fonction de l'hématocrite de tube de Lipowsky et al. (1980). A) Les symboles représentent les mesures expérimentales de la DO totale dans des suspensions de globules rouges. Les lignes pointillées indiquent la DO_{abs} mesurée dans des solutions d'hémoglobine. Les lignes pleines représentent la loi phénoménologique reliant DO et H_t , déterminée par ajustement aux données expérimentales. B) Composante de diffusion de la densité optique, les symboles représentent les mesure expérimentales de la DO totale moins la DO_{abs} , les lignes pleines représentent la loi phénoménologique reliant DO_{diff} et H_t , déterminée par ajustement aux données expérimentales.

d'onde et de l'angle d'ouverture du photodétecteur sont déterminants pour la mesure de DO . Par ailleurs, comme mentionné par Japee et al. (2005), il convient de prendre en compte la lumière qui arrive au capteur sans être atténuée par l'échantillon (« glare correction »). Il est aussi nécessaire d'introduire une zone noire dans l'image pour servir de zéro de référence. Une fois ces considérations prises en compte et leur processus de calibration effectué, Pries et al. (1983) ont mesuré la DO de suspensions de globules rouges. Ils relient eux aussi cette mesure à l'hématocrite, de façon empirique, pour différents diamètres de capillaires en verre (13 à 68 μm de diamètre).

Les mesures micro-photométriques de DO pour la détermination de l'hématocrite apparaissent donc complexes à mettre en œuvre et nécessitent une calibration rigoureuse, précise, et spécifique au système optique utilisé. Par exemple, l'impact de l'ouverture numérique du microscope, qui est un des paramètres influant sur la mesure de DO , a été étudié par Patel and Pittman (2002), qui ont notamment mis en évidence la complexité d'interprétation des résultats de cette mesure.

1.3.2.4 Conclusion

Pour la mesure d'hématocrite, il apparaît donc intéressant d'allier lorsque les conditions d'écoulement le permettent des mesures par comptage, qui sont faciles à mettre en œuvre, à des mesures micro-photométrique calibrées.

1.3.3 Les méthodes de mesure dans la microcirculation : conclusion

Au vu des techniques de mesures décrites ci-dessus, nous avons choisi d'une part d'étudier finement la technique de *dual-slit* pour la mesure de vitesse des globules rouges et d'autre part de mettre au point une technique fiable et compatible avec notre système expérimental de mesure de l'hématocrite. La vérification de la conservation de la masse entre les trois branches d'une bifurcation permettra de valider nos mesures (Cokelet et al., 1998).

1.4 Conclusion et objectifs de la thèse

Dans la microcirculation, la taille caractéristique des vaisseaux est comparable à la taille d'un globule rouge. Le sang est une suspension concentrée de cellules déformables, les globules rouges. En conséquence, les effets dynamiques non linéaires liés à la présence des globules rouges jouent un rôle crucial dans le transport de l'oxygène vers les tissus. En particulier, l'effet de séparation de phase aux bifurcations microvasculaires contribue à rendre la fraction volumique de globules rouges extrêmement hétérogène d'un vaisseau à l'autre.

Nous nous intéressons à étudier finement ce phénomène *in vitro*, dans un régime représentatif des conditions physiologiques, qui est rarement étudié en conditions d'écoule-

ment maîtrisées. Pour cela, un dispositif expérimental microfluidique a été mis au point. Les aspects métrologiques spécifiques aux suspensions concentrées de globules rouges ont tout d’abord été abordés dans l’objectif de quantifier les paramètres de l’écoulement. Ces paramètres sont le champ des vitesses, pour lequel nous avons choisi la technique de *dual-slit*, et le champ des concentrations, pour lequel nous allons considérer l’association de techniques de comptage et photométriques. Différents régimes d’écoulement seront d’abord explorés pour des micro-canaux uniques droits, en faisant varier le débit, la concentration et la taille des canaux. Une fois ces techniques de mesures maîtrisées, notre objectif sera l’étude de l’effet de séparation de phase dans des micro-bifurcations de différentes tailles, dans lesquelles les débits et les concentrations de globules rouges varient. Les résultats obtenus seront ensuite comparés à des simulations numériques de référence conduites avec des suspensions de particules sphériques rigides et monodisperses, ainsi qu’aux résultats obtenus *in vivo* par d’autres équipes.

1.5 Bibliographie

- Adrian, R. J. (1984). Scattering particle characteristics and their effect on pulsed laser measurements of fluid-flow - speckle velocimetry vs particle image velocimetry. *Appl Optics* 23(11), 1690–1691.
- Adrian, R. J. (2005). Twenty years of particle image velocimetry. *Experiments In Fluids* 39(2), 159–169.
- Baker, M. and H. Wayland (1974). On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7(1), 131 – 143.
- Barbee, J. H. and G. R. Cokelet (1971). The fåhræus effect. *Microvasc Res* 3(1), 6–16.
- Barclay, K. D., G. A. Klassen, and C. Young (2000). A method for detecting chaos in canine myocardial microcirculatory red cell flux. *Microcirculation* 7(5), 335–346.
- Barker, D. B. and M. E. Fourney (1977). Measuring fluid velocities with speckle patterns. *Optics Letters* 1(4), 135–7.
- Bosch T, Bes C, S. L. P. G. (2006). *Encyclopedia of sensors*, Chapter Optical feedback interferometry, pp. 1–20. American Scientific Publishers.
- Braun, R., A. Abbas, S. Bukhari, and W. Wilson (2002). Hemodynamic parameters in blood vessels in choroidal melanoma xenografts and rat choroid. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43(9), 3045–3052.
- Burns, J. M., X. X. Yang, O. Forouzan, J. M. Sosa, and S. S. Shevkoplyas (2012). Artificial microvascular network : a new tool for measuring rheologic properties of stored red blood cells. *Transfusion* 52(5), 1010–1023.

- Campagnolo, L., M. Nikolic, J. Perchoux, Y. Lim, J. Bertling, K. Loubière, L. Prat, A. Rakic, and T. Bosch (2012). Flow profile measurement in microchannel using the optical feedback interferometry sensing technique. *Microfluid. Nanofluidics*, 1–7. 10.1007/s10404-012-1029-0.
- Campagnolo, L., S. Roman, J. Perchoux, and S. Lorthois (2012). A new optical feedback interferometer for measuring red blood cell velocity distributions in individual capillaries : a feasibility study in microchannels. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 15(S1), 104–105.
- Campbell, N. A. and J. B. Reece (2004). *Biologie* (2 ed.). De Boeck Université.
- Choi, C. and R. Bennett (2003). Laser dopplers to determine cutaneous blood flow. *Dermatologic Surgery* 29(3), 272–280.
- Cokelet, G., A. Pries, and M. Kiani (1998). Observations on the accuracy of photometric techniques used to measure some in vivo microvascular blood flow parameters. *Microcirculation - London* 5(1), 61–70.
- Constantinescu, A. A., H. Vink, and J. A. E. Spaan (2001). Elevated capillary tube hematocrit reflects degradation of endothelial cell glycocalyx by oxidized ldl. *American Journal of Physiology heart and Circulatory Physiology* 280(3), 1051–1057.
- Cummins, H. Z., N. Knable, and Y. Yeh (1964). Observation of diffusion broadening of rayleigh scattered light. *Phys. Rev. Lett.* 12(6), 150–153.
- Desjardins, C. and B. Duling (1987). Microvessel hematocrit - measurement and implications for capillary oxygen-transport. *American Journal of Physiology* 252(3, Part 2), 494–503.
- Ditchfield, R. and W. Olbricht (1996). Effects of particle concentration on the partitioning of suspensions at small divergent bifurcations. *J. Biomech. Eng. Trans. Asme* 118(3), 287–294.
- Doyeux, V., T. Podgorski, S. Peponas, M. Ismail, and G. Coupier (2011). Spheres in the vicinity of a bifurcation : elucidating the zweifach-fung effect. *Journal of Fluid Mechanics* 674, 359–388.
- Dudderar, T. D. and P. G. Simpkins (1977). Laser speckle photography in a fluid medium. *Nature* 270(5632), 45–47.
- El-Kareh, A. W. and T. W. Secomb (2000). A model for red blood cell motion in bifurcating microvessels. *Int. J. Multiphase Flow* 26(9), 1545 – 1564.
- Fahraeus, R. (1929). The suspension stability of the blood. *Physiological Reviews* 9(2), 241–274.

- Fahraeus, R. and T. Lindqvist (1931). The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 96(2), 562–568.
- Feng, J. and S. Weinbaum (2001). Flow through an orifice in a fibrous medium with application to fenestral pores in biological tissue. *Chemical Engineering Science* 56(18), 5255 – 5268.
- Fujiwara, H., T. Ishikawa, R. Lima, N. Matsuki, Y. Imai, H. Kaji, M. Nishizawa, and T. Yamaguchi (2009). Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel. *J. Biomechanics* 42(7), 838–843.
- Gaehtgens, P. (1980). Flow of blood through narrow capillaries - rheological mechanisms determining capillary hematocrit and apparent viscosity. *Biorheology* 17(1-2), 183–189.
- Gaehtgens, P., H. Meiselman, and H. Wayland (1969). Evaluation of the photometric double slit velocity measuring method in tubes 25 to 130 bore. *Bibl Anat* 10, 571–578.
- Gaehtgens, P., H. J. Meiselman, and H. Wayland (1970b). Velocity profiles of human blood at normal and reduced hematocrit in glass tubes up to 130microns diameter. *Microvasc Res* 2(1), 13 – 23.
- Giuliani, G., M. Norgia, S. Donati, and T. Bosch (2002). Laser diode self-mixing technique for sensing applications. *Journal of Optics A - Pure and Applied Optics* 4(6), 283–294.
- Goldsmith, H. L. and J. C. Marlow (1979). Flow behavior of erythrocytes .2. particle motions in concentrated suspensions of ghost cells. *Journal of Colloid and Interface Science* 71(2), 383–407.
- Goldstone, J., H. Schmid-Schonbein, and R. Wells (1970). The rheology of red blood cell aggregates. *Microvasc Res* 2(3), 273 – 286.
- Golster, H., M. Linden, S. Bertuglia, A. Colantuoni, G. Nilsson, and F. Sjoberg (1999). Red blood cell velocity and volumetric flow assessment by enhanced high-resolution laser doppler imaging in separate vessels of the hamster cheek pouch microcirculation. *Microvasc Res* 58(1), 62–73.
- Grousson, R. and S. Mallick (1977). Study of flow pattern in a fluid by scattered laser-light. *Applied Optics* 16(9), 2334–2336.
- Holloway, G. and D. Watkins (1977). Laser doppler measurement of cutaneous blood-flow. *Journal of Investigative Dermatology* 69(3), 306–309.

- Humeau, A., W. Steenbergen, H. Nilsson, and T. Stromberg (2007). Laser doppler perfusion monitoring and imaging : novel approaches. *Medical and Biological Engineering and Computing* 45(5), 421–435.
- Ishikawa, T., H. Fujiwara, N. Matsuki, T. Yoshimoto, Y. Imai, H. Ueno, and T. Yamaguchi (2011). Asymmetry of blood flow and cancer cell adhesion in a microchannel with symmetric bifurcation and confluence. *Biomedical Microdevices* 13(1), 159–167.
- Japee, S., R. Pittman, and C. Ellis (2005). A new video image analysis system to study red blood cell dynamics and oxygenation in capillary networks. *Microcirculation* 12(6), 489–506.
- Jendrucko, R. and J. Lee (1973). The measurement of hematocrit of blood flowing in glass capillaries by microphotometry. *Microvasc Res* 6(3), 316 – 331.
- Johnson, P. C., D. L. Hudnall, and J. H. Dial (1973). Measurement of capillary hematocrit by photometric techniques. *Microvasc Res* 5(3), 351–6.
- Kanzow, G., A. Pries, and P. Gaehtgens (1982). Analysis of the hematocrit distribution in the mesenteric micro-circulation. *International Journal of Microcirculation - Clinical and Experimental* 1(1), 67–79.
- Keymel, S., J. Sichwardt, J. Balzer, E. Stegemann, T. Rassaf, P. Kleinbongard, M. Kelm, C. Heiss, and T. Lauer (2010). Characterization of the non-invasive assessment of the cutaneous microcirculation by laser doppler perfusion scanner. *Microcirculation* 17(5), 358–366.
- Koelink, M. H., F. F. M. Demul, A. L. Weijers, J. Greve, R. Graaff, A. C. M. Dassel, and J. G. Aarnoudse (1994). Fiber-coupled self-mixing diode-laser doppler-velocimeter - technical aspects and flow velocity profile disturbances in water and blood flows. *Applied Optics* 33(24), 5628–5641.
- Lee, J.-S. and B. R. Duling (1989). Role of flow dispersion in the computation of microvascular flows by the dual-slit method. *Microvasc Res* 37(3), 280 – 288.
- Lee, T. Q., G. W. Schmid-Schonbein, and B. W. Zweifach (1983). The application of an improved dual-slit photometric analyzer for volumetric flow rate measurements in microvessels. *Microvasc Res* 26(3), 351 – 361.
- Lima, R., T. Ishikawa, Y. Imai, M. Takeda, S. Wada, and T. Yamaguchi (2008). Radial dispersion of red blood cells in blood flowing through glass capillaries : The role of hematocrit and geometry. *Journal of Biomechanics* 41(10), 2188–2196.
- Lima, R., T. Ishikawa, Y. Imai, M. Takeda, S. Wada, and T. Yamaguchi (2009). Measurement of individual red blood cell motions under high hematocrit conditions using a confocal micro-ptv system. *Annals of Biomedical Engineering* 37(8), 1546–1559.

- Lima, R., S. Wada, M. Takeda, K.-i. Tsubota, and T. Yamaguchi (2007). In vitro confocal micro-piv measurements of blood flow in a square microchannel : The effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles. *Journal of Biomechanics* 40(12), 2752–2757.
- Lima, R., S. Wada, S. Tanaka, M. Takeda, T. Ishikawa, K.-i. Tsubota, Y. Imai, and T. Yamaguchi (2008). In vitro blood flow in a rectangular pdms microchannel : experimental observations using a confocal micro-piv system. *Biomed Microdevices* 10(2), 153–167.
- Lima, R., S. Wada, K. I. Tsubota, and T. Yamaguchi (2006). Confocal micro-piv measurements of three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel. *Measurement Science and Technology* 17, 797–808.
- Lipowsky, H., S. Usami, and S. Chien (1980). Invivo measurements of apparent viscosity and microvessel hematocrit in the mesentery of the cat. *Microvasc Res* 19(3), 297–319.
- Lipowsky, H. H., S. Usami, S. Chien, and R. R. N. Pittman (1980). Hematocrit determination in small bore tubes from optical-density measurements under white-light illumination. *Microvasc Res* 20(1), 51–70.
- Long, D. S., M. L. Smith, A. R. Pries, K. Ley, and E. R. Damiano (2004). Microviscometry reveals reduced blood viscosity and altered shear rate and shear stress profiles in microvessels after hemodilution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(39), 10060–10065.
- Lorthois, S., F. Cassot, and F. Lauwers (2011). Simulation study of brain blood flow regulation by intra-cortical arterioles in an anatomically accurate large human vascular network : Part i : Methodology and baseline flow. *Neuroimage* 54(2), 1031–1042.
- McDonald, J., D. Duffy, J. Anderson, D. Chiu, H. Wu, O. Schueller, and G. Whitesides (2000). Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* 21(1), 27–40.
- McDonald, J. and G. Whitesides (2002). Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc. Chem. Res.* 35(7), 491–499.
- Nishimura, N., N. L. Rosidi, C. Iadecola, and C. B. Schaffer (2010). Limitations of collateral flow after occlusion of a single cortical penetrating arteriole. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30(12), 1914–1927.
- Ong, P. K., B. Namgung, P. C. Johnson, and S. Kim (2010). Effect of erythrocyte aggregation and flow rate on cell-free layer formation in arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(6), 1870–1878.
- Park, J. S., C. K. Choi, and K. D. Kihm (2004). Optically sliced micro-piv using confocal laser scanning microscopy (clsm). *Experiments In Fluids* 37(1), 105–119.

- Patel, S. and R. Pittman (2002). Impact of microscope numerical aperture on microspectrophotometric measurements of hemoglobin in microvessels. *Microvasc Res* 64(2), 198–206.
- Pickering, C. J. D. and N. A. Halliwell (1984). Laser speckle photography and particle image velocimetry - photographic film noise. *Applied Optics* 23(17), 2961–2969.
- Pittman, R. and M. Ellsworth (1986). Estimation of red-cell flow in microvessels- consequences of the baker-wayland spatial averaging model. *Microvasc Res* 32(3), 371–388.
- Popel, A. and P. Johnson (2005). Microcirculation and hemorheology. *Annu. Rev. Fluid. Mech.* 37, 43–69.
- Pries, A., G. Kanzow, and P. Gaehtgens (1983). Microphotometric determination of hematocrit in small vessels. *American Journal of Physiology* 245(1), 167–177.
- Pries, A., T. Secomb, P. Gaehtgens, and J. Gross (1990). Blood-flow in microvascular networks - experiments and simulation. *Circulation research* 67(4), 826–834.
- Pries, A. R., A. Fritzsche, K. Ley, and P. Gaehtgens (1992). Redistribution of red-blood-cell flow in microcirculatory networks by hemodilution. *Circulation Research* 70(6), 1113–1121.
- Pries, A. R., K. Ley, M. Claassen, and P. Gaehtgens (1989). Red cell distribution at microvascular bifurcations. *Microvasc Res* 38(1), 81 – 101.
- Pries, A. R., D. Neuhaus, and P. Gaehtgens (1992). Blood viscosity in tube flow : dependence on diameter and hematocrit. *American Journal of Physiology* 263(6 Pt 2), 1770–8.
- Raffel, M., C. E. Willert, S. T. Wereley, and J. Kompenhans (2007). *Particle Image Velocimetry. A practical guide*. Springer.
- Riva, C., B. Ross, and G. B. Benedek (1972). Laser doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Investigative Ophthalmology* 11(11), 936–44.
- Riva, C. E. (2001). Basic principles of laser doppler flowmetry and application to the ocular circulation. *International Ophthalmology* 23(4-6), 183–9.
- Sakai, H., A. Sato, N. Okuda, S. Takeoka, N. Maeda, and E. Tsuchida (2009). Peculiar flow patterns of rbc's suspended in viscous fluids and perfused through a narrow tube (25 microns). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297(2), 583–589.
- Salazar Vazquez, B. Y., C. M. Hightower, F. Sapuppo, D. M. Tartakovsky, and M. Intaglietta (2010). Functional optical imaging at the microscopic level. *J Biomed Opt* 15(1).

- Sapuppo, F., M. Bucolo, M. Intaglietta, P. C. Johnson, L. Fortuna, and P. Arena (2007). An improved instrument for real-time measurement of blood flow velocity in microvessels. *IEEE Trans Instrum Meas* 56(6), 2663–2671.
- Schaffer, C. B., B. Friedman, N. Nishimura, L. F. Schroeder, P. S. Tsai, F. F. Ebner, P. D. Lyden, and D. Kleinfeld (2006). Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion. *PLoS Biology* 4(2), e22.
- Schmid-schoenbein, G. and B. Zweifach (1975). Rbc velocity profiles in arterioles and venules of rabbit omentum. *Microvasc Res* 10(2), 153–164.
- Secomb, T., R. Hsu, and A. Pries (2002). Blood flow and red blood cell deformation in nonuniform capillaries : effects of the endothelial surface layer. *Microcirculation* 9, 189–196.
- Shelby, J. P., J. White, K. Ganesan, P. K. Rathod, and D. T. Chiu (2003). A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by plasmodium falciparum infected erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(25), 14618–14622.
- Shevkoplyas, S., S. Gifford, T. Yoshida, and M. Bitensky (2003). Prototype of an in vitro model of the microcirculation. *Microvasc Res* 65(2), 132–136.
- Silva, J. and M. Intaglietta (1974). The correlation of photometric signals derived from in vivo red blood cell flow in microvessels. *Microvasc Res* 7(2), 156–69.
- Stern, M. D. (1975). In vivo evaluation of microcirculation by coherent light-scattering. *Nature* 254(5495), 56–58.
- Sugii, Y., R. Okuda, K. Okamoto, and H. Madarame (2005). Velocity measurement of both red blood cells and plasma of in vitro blood flow using high-speed micro piv technique. *Meas Sci Technol* 16, 1126–1130.
- Tanaami, T., S. Otsuki, N. Tomosada, Y. Kosugi, M. Shimizu, and H. Ishida (2002). High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and nipkow disks. *Applied Optics* 41(22), 4704–4708.
- Touhami, A., A. Othmane, O. Ouerghi, H. B. Ouada, C. Fretigny, and N. Jaffrezic-Renault (2002). Red blood cells imaging and antigene/antibody interaction measurement. *Biomolecular Engineering* 19, 189 – 193.
- Vayssairat, M. and P. Carpentier (1996). *Microcirculation clinique*. Masson.

- Villela, N. R., P. Cabrales, A. G. Tsai, and M. Intaglietta (2009). Microcirculatory effects of changing blood hemoglobin oxygen affinity during hemorrhagic shock resuscitation in an experimental model. *Shock* 31(6), 645–652.
- Watkins, D. and G. Holloway (1978). Instrument to measure cutaneous blood-flow using doppler-shift of laser-light. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 25(1), 28–33.
- Wayland, H. (1973). Photosensor methods of flow measurement in the microcirculation. *Microvasc Res* 5(3), 336–50.
- Wayland, H. and P. C. Johnson (1967). Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric method. *J. Appl. Physiol.* 22(2), 333–7.

Chapitre 2

Écoulements *in vitro* de globules rouges en micro-canaux : dispositif expérimental

Pour étudier les écoulements de globules rouges en micro-canaux, un dispositif expérimental microfluidique a été conçu et fabriqué. L'objectif est, dans un premier temps, de mettre en place la métrologie de ces écoulements à l'aide de canaux uniques droits, puis d'étudier l'effet de séparation de phase aux niveaux de micro-bifurcations. Ce chapitre présente d'abord les géométries des micro-canaux réalisés et leur méthode de fabrication. Puis nous décrivons le système fluidique mis en place pour engendrer les écoulements dans le micro-système. Ensuite, nous présentons les suspensions qui seront étudiées ainsi que leur mode de préparation. Enfin, nous décrivons le système optique utilisé pour l'acquisition et l'enregistrement de séquences d'images des écoulements.

2.1 Les micro-canaux

La géométrie des canaux est dessinée grâce au logiciel CleWin, puis imprimée sur un masque verre-chrome par lithographie laser. Le masque verre-chrome sert à la fabrication du moule contenant le relief des canaux en positif, grâce à la technique de photolithographie (Section 2.1.2). Du PDMS est ensuite coulé sur ce moule et sur un autre moule parfaitement lisse (Section 2.1.3). Le micro-système final est obtenu par l'assemblage des deux disques de PDMS. Les différentes étapes pour réaliser un micro-système sont schématisées sur la figure 2.1.1 et détaillées ci-dessous.

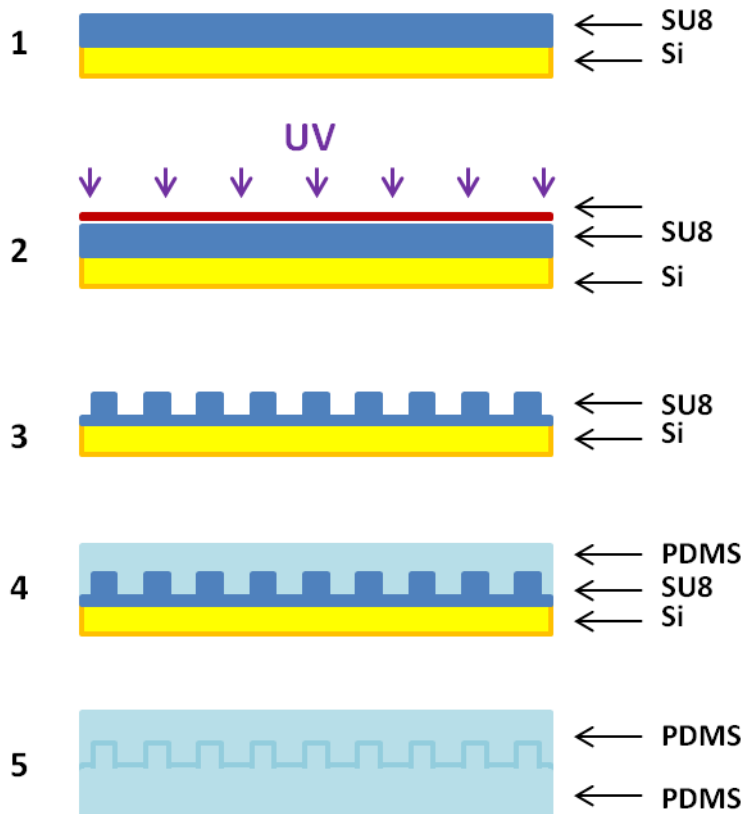


FIGURE 2.1.1: **Schéma du protocole de réalisation des micro-canaux** par photolithographie et moulage de PDMS. 1. la résine est répartie sur le support en silicium. 2. En présence du photomasque le tout est exposé aux UVs. 3. Après développement, les parties non exposées aux UVs sont dissoutes. 4. Le PDMS est coulé sur le moule. 5. La couche de PDMS avec les canaux en négatif est assemblée avec une couche de PDMS lisse.

2.1.1 Géométries des micro-canaux

2.1.1.1 Canaux uniques droits

Dans un premier temps, nous avons réalisé des canaux droits uniques de 8 mm de long et de sections carrées de différentes tailles $40\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$, $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ et $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$. Chaque canal est relié en amont à un canal d'alimentation et en aval à un canal de drainage, chacun mesure 15 mm de long et est de largeur plus importante que la section d'essai ($100\mu\text{m} \times 40\mu\text{m}$, $100\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, $50\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$, $50\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$). A chaque extrémité des canaux d'alimentation et de drainage, un trou de 1 mm de diamètre permet les échanges de fluide avec l'extérieur. Les détails de l'architecture des canaux sont présentés en Annexe A. Pour chaque profondeur de canal (de 5 à 40 μm), un fichier décrivant la géométrie des canaux, un masque verre-chrome et un moule ont été réalisés. À partir d'un moule contenant les canaux en positif, nous pouvons fabriquer de multiples micro-systèmes en PDMS.

2.1.1.2 Micro-bifurcations

Nous avons par la suite réalisé des micro-canaux pour l'étude de l'effet de séparation de phase au niveau de micro-bifurcations. Pour permettre le contrôle du débit et de l'hématocrite dans des bifurcations divergentes de différentes tailles, le choix s'est porté sur des bifurcations uniques composées de trois branches. Le canal d'entrée et les deux canaux de sorties ont chacun une section de soit $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ soit $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$. La bifurcation a la forme d'un T, ce qui permet de s'affranchir des contraintes géométriques liées à une forme en Y (Doyeux et al., 2011). L'architecture du réseau a été conçue de sorte que les trois branches d'une bifurcation soient visibles à l'aide de notre système optique sur une longueur de canal assez grande pour pouvoir appliquer nos méthodes de mesures des écoulements, tout en minimisant la taille des images à enregistrer. C'est dans ce but que la forme des quatre types de bifurcations étudiées, présentées en figure 2.1.2, a été adoptée. Le canal d'entrée du fluide est celui situé au milieu de la bifurcation. Nous avons quatre modèles de micro-bifurcations, pour lesquels nous adoptons la notation $W^1\mu\text{m}-W^e\mu\text{m}-W^2\mu\text{m}$, où W est la largeur du canal, les exposants 1 et 2 font références aux branches filles et l'exposant e à la branche d'entrée. Les quatre types de bifurcations sont donc notés :

- $20\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$: le canal d'entrée et les deux canaux de sortie ont une section de $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$,
- $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$: le canal d'entrée et un canal de sortie ont une section de $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, l'autre canal de sortie a une section de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$,
- $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-10\mu\text{m}$: le canal d'entrée a une section de $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ et les deux canaux de sortie ont une section de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$,
- $10\mu\text{m}-10\mu\text{m}-10\mu\text{m}$: le canal d'entrée et les deux canaux de sortie ont une section de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$.

Nous avons donc trois géométries symétriques et une asymétrique (la $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$).

Comme dans le cas des canaux droits, les micro-canaux à section carrée sont alimentés et drainés par des canaux plus larges. Pour une micro-bifurcation, on a donc un canal d'alimentation et deux canaux de drainages (de section $100\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ ou $50\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$). Les trous d'alimentation situés aux extrémités des canaux doivent être suffisamment distants (3 mm centre à centre) pour permettre la connexion de trois réservoirs de fluide (cf. Section 2.2). La géométrie complète d'une bifurcation est présentée en figure 2.1.2 a.

Pour réaliser un moule, contenant le réseau de bifurcations en positif, deux masques verre-chrome sont nécessaires. Sur le premier masque, l'ensemble du réseau de bifurcations est imprimé et apparaîtra avec une hauteur de $10\mu\text{m}$ sur le moule. Seuls les canaux les plus grands ($20\mu\text{m}$) figurent sur le deuxième masque, ils apparaîtront avec une hauteur de $10\mu\text{m}$ supplémentaires sur le moule (voir le procédé de photolithographie, section suivante). L'architecture des canaux est décrite en Annexe A.

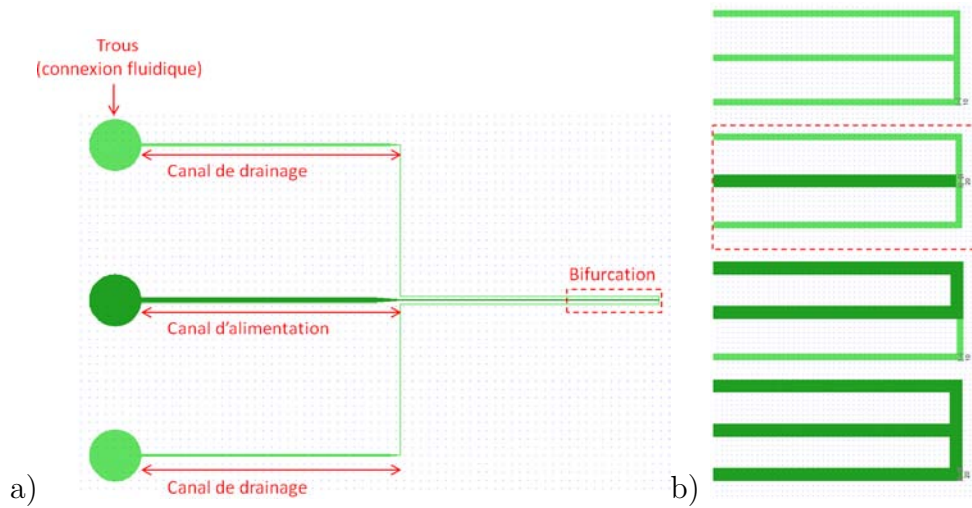


FIGURE 2.1.2: **Dessin des micro-bifurcations** avec le logiciel CleWin. a) Une bifurcation avec son canal d'alimentation et ses deux canaux de drainage. b) Détail des quatre modèles de bifurcations étudiées, elles sont formées de canaux à section carrée de $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ (vert clair) ou $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ (vert foncé).

2.1.2 Fabrication des moules par photolithographie

Nous avons réalisé les moules dans la « zone photolithographie de la plateforme de micro et nanotechnologies » du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS-CNRS). Le principe de la photolithographie est le suivant : une image imprimée sur un masque verre-chrome est reproduite sur un substrat en silicium. Pour cela, le substrat est recouvert d'une couche de résine photosensible (étape 1 sur la figure 2.1.1). Le masque est ensuite superposé à ce substrat. L'ensemble est exposé à un rayonnement ultra violet (UV) (étape 2), et la zone de la couche de résine qui est exposée subit une

transformation chimique. Nous utilisons une résine négative, le SU8, cela signifie que la solubilité de la zone exposée aux UVs diminue. Cette zone est alors insensible au traitement chimique appliqué par la suite : c'est la phase de développement (étape 3). Après cette étape le moule est obtenu : l'image présente sur le masque est gravée en positif sur le substrat. La hauteur des micro-canaux en SU8 sur le moule dépend de la viscosité de la résine utilisée, de la quantité appliquée, et de la façon dont la résine est répartie sur le substrat. La durée de l'exposition aux UVs et la durée de la phase de développement sont aussi des paramètres à considérer pour obtenir la hauteur souhaitée. Pour chaque hauteur de résine (5, 10, 20 ou 40 μm), un protocole expérimental précis est donc développé.

Dans le cas des micro-bifurcations, deux hauteurs différentes de résine sont nécessaires sur un seul moule. Le protocole de photolithographie décrit ci-dessus est alors appliqué deux fois. Le support en silicium est recouvert d'une première couche de résine qui aura une épaisseur finale de 10 μm . Nous y apposons le premier masque sur lequel la géométrie de tous les canaux est imprimée. Après les phases d'exposition aux UVs et de développement, une seconde couche de résine est répartie sur ce même substrat ; elle aura aussi une épaisseur finale de 10 μm . Cette fois le deuxième masque y est appliqué, il contient la géométrie des canaux qui auront une hauteur de 20 μm sur le moule. Les étapes d'exposition aux UVs et de développement sont répétées. La deuxième exposition aux UVs est une étape délicate car le masque doit être parfaitement aligné avec la géométrie de la première couche de résine, afin que les deux couches de résines coïncident exactement. Des mires d'alignement, dessinées initialement sur les deux masques, permettent de réaliser cette opération : à l'aide d'un microscope, les mires du second masque sont superposées précisément avec les mires imprimées sur le substrat (provenant du premier masque), cela juste avant d'exposer l'ensemble substrat-masque aux UVs pour la deuxième fois.

Une fois qu'un moule est réalisé, nous mesurons la hauteur des micro-canaux en SU8, à l'aide d'un profilomètre à contact, afin de vérifier qu'elle correspond bien à celle attendue. Si ce n'est pas le cas, il faut ajuster le protocole de photolithographie. Nous avons ainsi mesuré pour les canaux droits : 44,5 μm \pm 0,1 μm , 17,7 μm \pm 0,05 μm , 10,4 μm \pm 0,05 μm et 5,4 μm \pm 0,05 μm . Et pour les micro-bifurcations : 10,0 μm \pm 0,1 μm et 20,5 μm \pm 0,2 μm .

Avant de couler le PDMS sur un moule (étape suivante, Section 2.1.3), nous appliquons un traitement anti-adhésif à la surface des moules, afin de pouvoir démouler le PDMS du silicium. Les moules sont traités par silanisation, ce qui consiste à greffer à leur surface une mono-couche d'octadécyltrichlorosilane (OTS), un composé organo-métallique. Pour cela, nous utilisons du Trichloro(1H, 1H, 2H, 2H -perfluorooctyl)silane, ou F-OTS, qui est déposé en phase gazeuse à la surface des moules.

2.1.3 Moulage et collage du PDMS

Les étapes 4 et 5 de la figure 2.1.1 représentent les étapes de moulage et d'assemblage du PDMS. Dans un premier temps, le produit de base (PDMS liquide, SYLGARD®184 Silicone elastomer) et le durcisseur (SYLGARD®184 Curing agent) sont mélangés à des proportions de 10 pour 1 en masse. Le mélange est dégazé sous vide puis coulé sur le moule qui contient les micro-canaux en positif (étape 4). Enfin, il est cuit à 65°C pendant une heure. La couche de PDMS est ensuite démoulée ; elle contient la réplique des micro-canaux en négatif. Pour permettre l'alimentation en fluide des canaux, les entrées et sorties du dispositif microfluidique sont percées à l'aide d'un emporte-pièce qui a la taille des futurs tubes extérieurs. Ensuite, afin d'être parfaitement propre, le PDMS est placé dans du détergent (Decon 90) et dans un bain à ultrasons. Finalement, il est assemblé avec un autre exemplaire de PDMS (étape 5) qui a été coulé sur un moule lisse. Cette couche de PDMS lisse a été partiellement cuite (30-40min à 55°C), afin d'être démoulée facilement, mais sans être toutefois complètement réticulée pour permettre la formation de liaisons à l'interface entre les deux couches de PDMS. Cette technique d'assemblage des deux couches de PDMS est décrite par Go and Shoji (2004); Eddings and Gale (2008). Une fois assemblées, les deux couches de PDMS sont chauffées à 110°C pendant 15 min de sorte à solidifier leurs liaisons.

La figure 2.1.3 présente la photographie d'une bifurcation en PDMS. Les petites imperfections visibles au niveau du canal d'entrée (bords plus épais irréguliers par endroits) sont dues au procédé de photolithographie. Lors de la phase d'alignement (voir Section 2.1.2) du second masque et du substrat contenant la première couche de résine, la deuxième couche n'a pas été parfaitement alignée avec la première ; ces légers décalages (Δx et Δz) sont visibles sur la figure 2.1.3 qui montre les micro-canaux après le moulage du PDMS.

2.2 Système fluidique

L'écoulement dans les micro-canaux est engendré par un contrôleur de pression (MicroFluidics Control System 8C, Fluigent). Les pressions imposées en entrée et/ou en sortie de canaux, via un logiciel relié au contrôleur de pression, peuvent varier de 0,5 à 1100 mbar. L'utilisation d'un contrôleur de pression a été préférée à celle d'un pousse-seringue car la stabilité de l'écoulement est bien meilleure, surtout pour les petits débit ($<1 \mu\text{L}/\text{min}$), et car nous pouvons alimenter le canal en fluide de façon très simple. En effet, nous utilisons de petits réservoirs (dispense tips, Nordson EFD), qui sont directement connectés en entrée ou en sortie des canaux grâce à une pointe de distribution en acier courbée à 90° et de 0,8 mm de diamètre interne (voir figure 2.2.1). Ces réservoirs contiennent soit la suspension à étudier soit du liquide physiologique. Ils sont fermés puis reliés au contrôleur de pression par un tube souple (Fisher) contenant l'air poussé. Cette configuration, voir figure 2.2.1, permet de placer l'ensemble du dispositif sous les

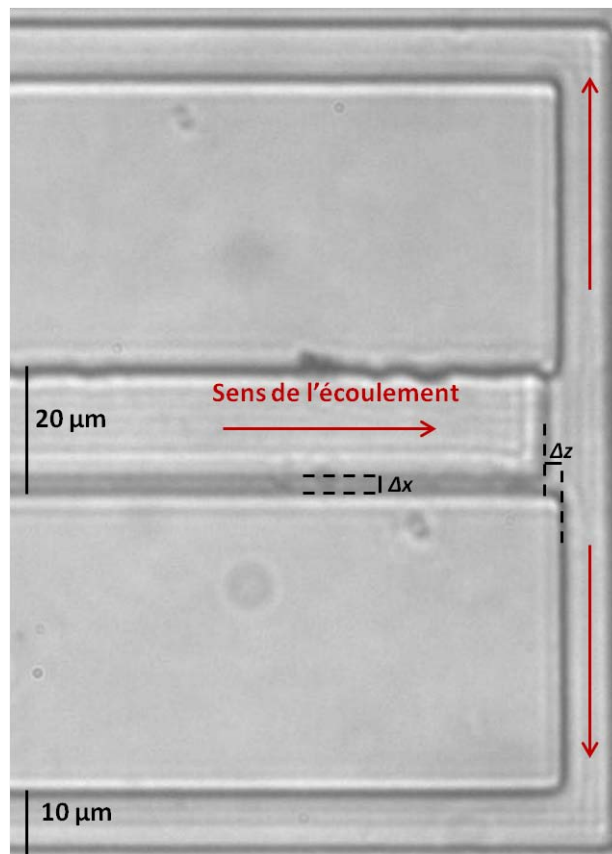


FIGURE 2.1.3: **Bifurcation 10μm-20μm-10μm en PDMS** , Δx et Δz montrent le léger décalage des deux couches de résines lors de la fabrication du moule en SU8.

objectifs du microscope. De plus, les quantités de fluide et les longueurs de tubes utilisées pour alimenter le micro-système sont minimisées, afin de limiter les problèmes de fuites, de volumes morts ou de bulles d'air.

Un canal est d'abord rempli avec du liquide physiologique, qui est introduit dans un réservoir ($\sim 50 \mu\text{L}$) connecté au contrôleur de pression. Une fois le canal rempli, la suspension de globules rouges est introduite par un second réservoir connecté à une autre extrémité du micro-canal. Avant de connecter le réservoir avec les globules rouges dans le PDMS, la suspension est légèrement poussée afin qu'une goutte se forme à la sortie du tube de distribution. Le liquide physiologique est lui poussé à sortir à l'endroit où le réservoir avec les globules rouges sera connecté. Cette procédure permet d'éviter l'apparition de bulles d'air dans le canal, qui perturberaient l'écoulement.

Dans le cas d'une bifurcation, trois réservoirs sont reliés au contrôleur de pression. La suspension de globules rouges est introduite dans la branche du milieu (cf. figure 2.1.3). Les deux autres branches sont connectées à un réservoir contenant du liquide physiologique. Pour une bifurcation et une pression d'entrée donnée, il est possible de faire varier la pression en sortie d'un des canaux, dans le but de dissymétriser l'écoulement après la bifurcation. Il convient d'éviter de connecter et de déconnecter les réservoirs afin d'empêcher l'introduction de débris de PDMS dans les canaux qui se bouchent très facilement. Malgré les précautions prises, des poussières ou des globules rouges finissent par boucher les canaux. En conséquence un micro-canal droit ou une micro-bifurcation ne sert généralement qu'à une seule série d'expériences réalisée avec une suspension donnée.

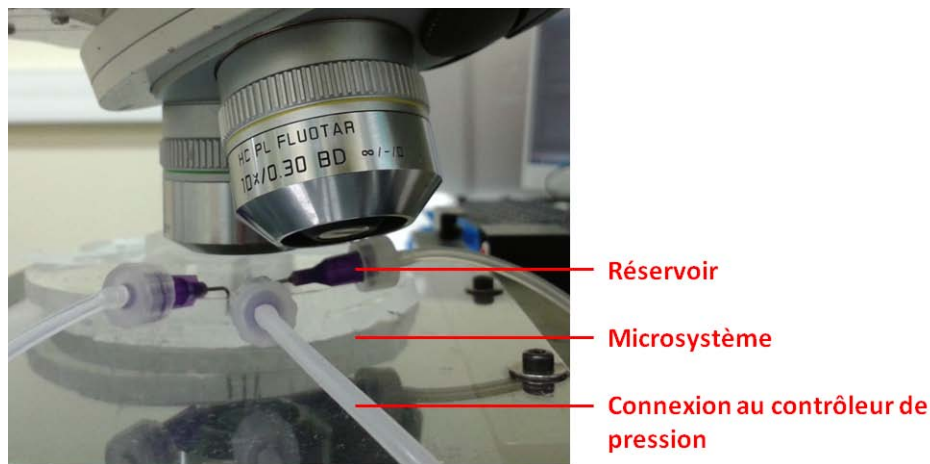
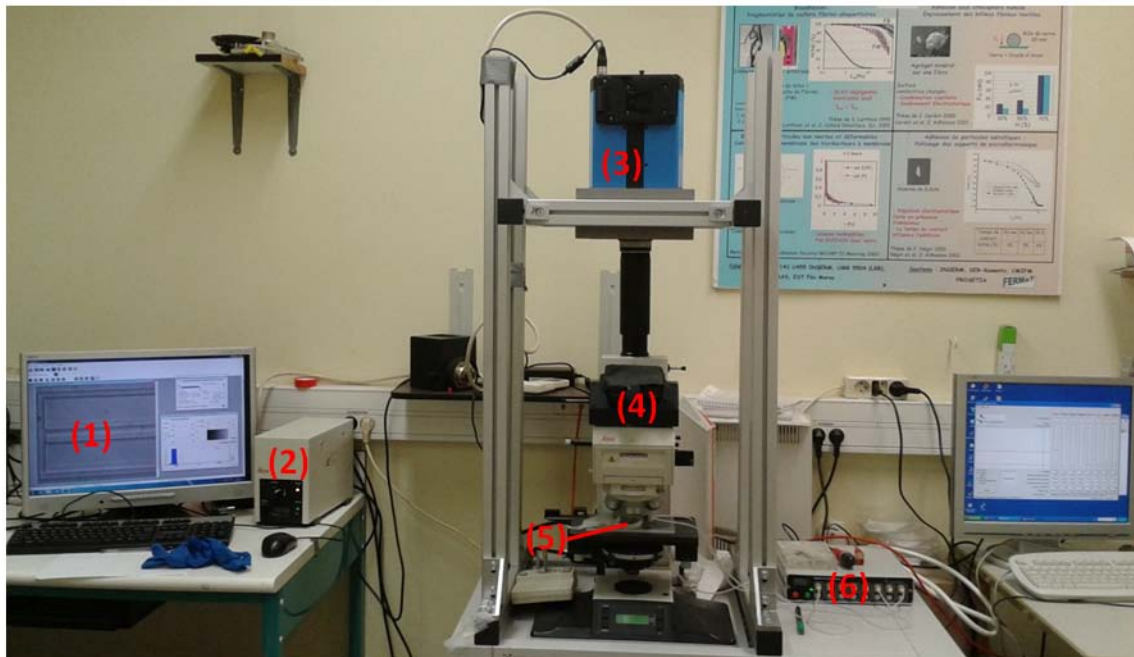


FIGURE 2.2.1: **Micro-système et connectique.** Le micro-système en PDMS est placé sous l'objectif du microscope. Un réservoir alimente en fluide le canal d'entrée de la bifurcation et deux réservoirs récupèrent le fluide en sortie. Le bouchon de chaque réservoir est relié au contrôleur de pression *via* un tube souple pressurisé.



(1) Visualisation
(2) Source lumineuse
(3) Caméra rapide

(4) Microscope
(5) Microsystème
(6) Contrôleur de pression

FIGURE 2.2.2: **Dispositif expérimental.** Le micro-système est placé sous le microscope, l'écoulement est engendré par le contrôleur de pression piloté par l'ordinateur à droite sur la photo. Une caméra rapide est reliée au microscope. Les séquences d'images de l'écoulement sont visualisées et enregistrées sur l'ordinateur présent à gauche sur l'image.

2.3 Préparation des suspensions

Suspensions de globules rouges

Nous inspirant des travaux de Shevkoplyas et al. (2003), nous avons utilisé différents milieux pour la préparation des globules rouges : le Phosphate Buffured Saline (PBS : 9 mM de Na_2HPO_4 , 1.3 mM de NaH_2PO_4 et 140 mM de NaCl), le Glucose Albumine Sodium Phosphate (GASP : PBS + 5,5 mM de glucose et 10 mg/mL d'albumine de sérum bovin (BSA)) et le PBS-EDTA (PBS contenant 1,5 mg/mL d'acide éthylène diamine tétra-acétique, un anticoagulant). Le sérum d'albumine bovine (BSA) présent dans le GASP empêche l'agrégation des globules rouges dans nos suspensions.

Les suspensions de globules rouges sont préparées au laboratoire à partir d'échantillons de sang d'environ 50 μL prélevés sur un volontaire sain, l'expérimentateur en l'occurrence. Ces prélèvements sont effectués à l'extrémité du doigt avec un stylo auto piqueur. Le sang prélevé est immédiatement dilué dans 500 μL de PBS-EDTA. Les globules rouges sont ensuite lavés. Pour cela, la suspension est centrifugée (1400 g, 6 min) puis le culot est remis en suspension dans du tampon GASP. Cette étape de rinçage est répétée 3 fois. Pour finir, un volume connu de culot de globules rouges lavés est dilué dans un volume connu de milieu suspensif. De ce fait, la fraction volumique de globules rouges dans la suspension finale est maîtrisée, elle correspond à l'hématocrite de réservoir. Lors de cette dernière étape, un milieu particulier est utilisé pour suspendre les globules rouges. Afin d'éviter que les globules rouges ne sédimentent dans les réservoirs ou dans les canaux, le milieu final doit avoir la même densité que les globules, *i.e.* 1,09-1,1 g/mL. Pour cela, une solution communément employée pour réaliser des gradients de densité est utilisée : l'Optiprep (Axis-Shield). Une solution stock contenant 90% d'Optiprep et 10% de GASP $\times 10$ (GASP concentré 10 fois) est d'abord préparée. Les proportions de solution stock et de GASP, nécessaires pour assurer au milieu final de suspension des globules rouges d'avoir la même densité que les globules rouges, ont été déterminées (cf. Annexe B). Ce milieu est composé de 35% de solution stock et 65% de GASP.

Les valeurs du pH, de la conductivité ionique (σ) et de l'osmolalité (Osm, moles de particules en solution par kg de solvant) des milieux de suspension des globules rouges, doivent être proches des valeurs connues pour le plasma sanguin : pH=7,4, $\sigma \sim 1,3 \text{ S/m}$ et $Osm = 290 \text{ mOsm/kgH}_2\text{O}$. Les globules rouges sont en effet très sensibles au phénomène d'osmose. Si l'eau pénètre par osmose dans le globule rouge, celui-ci peut gonfler au point de se déchirer (hémolyse). Si au contraire la concentration en sel est trop élevée, les globules vont se flétrir et former ce que l'on appelle des échinocytes. La concentration en sels des milieux de suspension des globules rouges est donc rigoureusement ajustée. Le pH et la conductivité ionique du milieu final ont été mesurés : pH=7,4 et $\sigma = 1,1 \text{ S/m}$. Concernant l'osmolalité, Shevkoplyas et al. (2003) précisent que l'osmolalité du GASP est de 290mOsm/kgH₂O. Par ailleurs, l'Optiprep est composé de 60% d'iodixanol dans de l'eau, et l'iodixanol a une osmolalité de 290 mOsm/kg H₂O. L'équilibre osmotique est donc garanti dans notre milieu de suspension des globules rouges, ce qui est d'ailleurs

confirmé par nos observations microscopiques des globules (voir figure 2.3.1).

Suspensions de latex

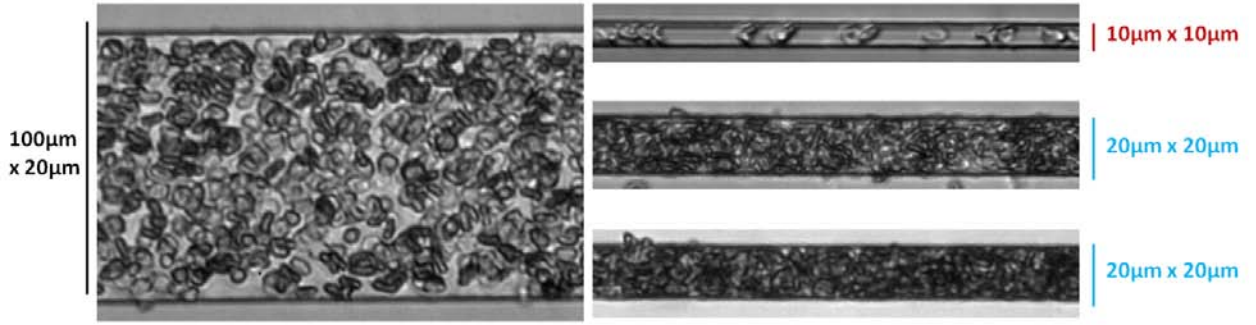
Lors de la mise au point des techniques expérimentales, nous avons utilisé des suspensions de particules de latex. L'avantage de ces suspensions est qu'elles peuvent être plus rapidement préparées et en plus grande quantité que les suspensions de globules rouges. La solution mère (Invitrogen) est une suspension concentrée de particules de latex monodisperses de 4,1 μm de diamètre dans de l'eau (2% v/v). Pour éviter la sédimentation des particules, on les suspend dans un milieu composé d'eau et de glycérol, qui a la même densité que les particules (1,055 g/mL). Pour cela, le glycérol est présent à 24% en masse dans l'eau. La fraction volumique finale de particules de latex en suspension est généralement de l'ordre de 0,05%.

2.4 Visualisation : microscope et caméra

Le système d'acquisition utilisé est composé d'un microscope Leica (DMRXA2), équipé de trois objectifs ($\times 10$, $\times 20$ et $\times 50$) à longue distance de travail, sur lequel est montée une caméra. Trois caméras ont été utilisées au cours de la thèse : une caméra CCD (PCO Sensicam avec un capteur de 1280×1024 pixels et un encodage sur 12 bits), une caméra rapide APX (capteur 1024×1024 pixels, 10 bits) et une caméra rapide Dimax (capteur 2016×2016 pixels, 12 bits). Le pilotage des paramètres d'acquisition et d'enregistrement des images est effectué grâce au logiciel CamWare. La fréquence d'acquisition est limitée à 20 images/s avec la Sensicam, ce qui n'est pas suffisant pour la mesure des écoulements de globules rouges. C'est pourquoi nous utilisons une caméra rapide pour pouvoir quantifier des vitesses. Les fréquences d'acquisitions généralement utilisées sont comprises entre 1000 à 4000 images/s, mais pour certaines expériences nous sommes descendus jusqu'à 100 fps et montés jusqu'à 10000 fps. Avec l'objectif $\times 20$, la résolution des images est d'environ 3 pixels/ μm pour la Sensicam et l'APX et de 4,3 pixels/ μm pour la Dimax. En plus d'avoir une très bonne résolution, la Dimax présente l'avantage de pouvoir imager des champs plus grands en conservant une bonne résolution même lorsque la fréquence d'acquisition devient importante. Tandis qu'avec l'APX, la taille possible des images à enregistrer diminue rapidement quand la fréquence d'acquisition augmente. Or nous avons besoin d'assez grandes images ($200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ environ) pour voir les trois branches d'une bifurcation simultanément. De plus, le transfert des images de la mémoire de la caméra vers celle de l'ordinateur est beaucoup plus rapide avec la Dimax, qui permet donc d'enregistrer facilement plusieurs films d'une même série d'essais (même canal, même suspension mais débits différents, par exemple).

Par ailleurs, comme nous travaillons avec de hautes fréquences d'acquisition et des suspensions concentrées de globules rouges qui atténuent beaucoup la lumière incidente, nous avons opté pour un système d'éclairage puissant. Il s'agit d'une source de lumière

(A)



(B)

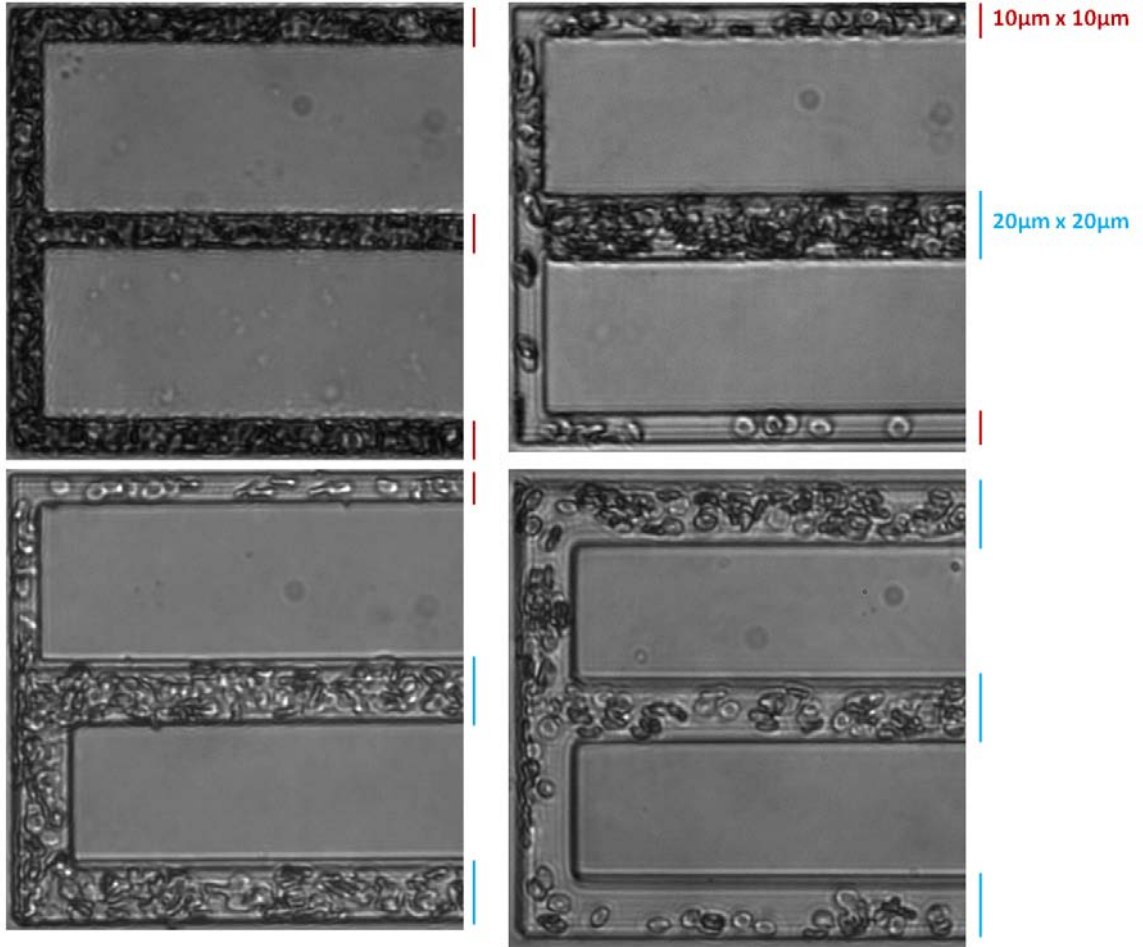


FIGURE 2.3.1: Images d'écoulements de globules rouges dans les micro-canaux, objectif $\times 20$. (A) **Micro-canaux uniques droits**, acquisition avec la caméra APX, de gauche à droite et de haut en bas : - sections : $100\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$, $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, - hématocrites de réservoir : 40%, 30%, 40%, 60%, - fréquences d'acquisition : 2000 fps, 1000 fps, 2000 fps, 2000 fps. (B) **Micro-bifurcations**, acquisition avec la caméra Dimax, de gauche à droite et de haut en bas : - type de bifurcation : $10\mu\text{m}-10\mu\text{m}-10\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-10\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$, $20\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$, - hématocrite de réservoir : 45%, 30%, 30%, 25%, - fréquences d'acquisition : 500 fps, 1000 fps, 1000 fps, 2000 fps.

externe collimatée dont l'intensité lumineuse est réglable (Leica, EL 6000 type métal halide).

2.5 Conclusion

L'ensemble du dispositif expérimental mis en place (cf. figure 2.2.2) nous permet donc d'obtenir des séquences d'images d'écoulements de globules rouges (voir figure 2.3.1) ou bien de particules de latex. Une fois ce dispositif optimisé (moulage et collage du PDMS réussis, gammes de pression à appliquer déterminées, absence de bulles et de poussières, etc.), les mesures de vitesses et de concentrations de ces écoulements ont été mises au point sur les canaux uniques droits. Les écoulements de globules rouges au niveau des quatre types de micro-bifurcations présentés ont ensuite pu être étudiés. Différentes gammes de concentrations et débits de globules rouges ont été explorées dans le but de caractériser l'effet de séparation de phase.

2.6 Bibliographie

- Doyeux, V., T. Podgorski, S. Peponas, M. Ismail, and G. Coupier (2011). Spheres in the vicinity of a bifurcation : elucidating the zweifach-fung effect. *Journal of Fluid Mechanics* 674, 359–388.
- Eddings, M. A., J. M. A. and B. K. Gale (2008). Determining the optimal pdms-pdms bonding technique for microfluidic devices. *J. Micromech. Microeng.* 18.
- Go, J. and S. Shoji (2004). A disposable, dead volume-free and leak-free in-plane pdms microvalve. *Sensors and Actuators. A, Physical* 114, 438–444.
- Shevkoplyas, S., S. Gifford, T. Yoshida, and M. Bitensky (2003). Prototype of an in vitro model of the microcirculation. *Microvasc Res* 65(2), 132–136.

Chapitre 3

Développements métrologiques

Nous avons discuté précédemment les particularités des écoulements étudiés (fortes concentrations, petits canaux) et décrit les différentes méthodes connues qui permettent de mesurer les vitesses et les hémotocrites de micro-écoulements de globules rouges. Nous décrivons ici les méthodes choisies et développées dans le cadre de ce travail pour mesurer, dans un premier temps, la vitesse des globules rouges (3.1), puis l'hématocrite (3.2), pour enfin en déduire le débit de globules rouges et le débit de fluide suspendant (3.3).

Dans ce qui suit, les axes $0y$, $0x$ et $0z$ correspondent respectivement à la direction du faisceau lumineux, à l'axe transversal et à l'axe longitudinal (direction de l'écoulement) du canal (voir figure 3.0.1). L'origine des axes est prise au centre du canal. Les images expérimentales sont une projection dans le plan $0xz$.

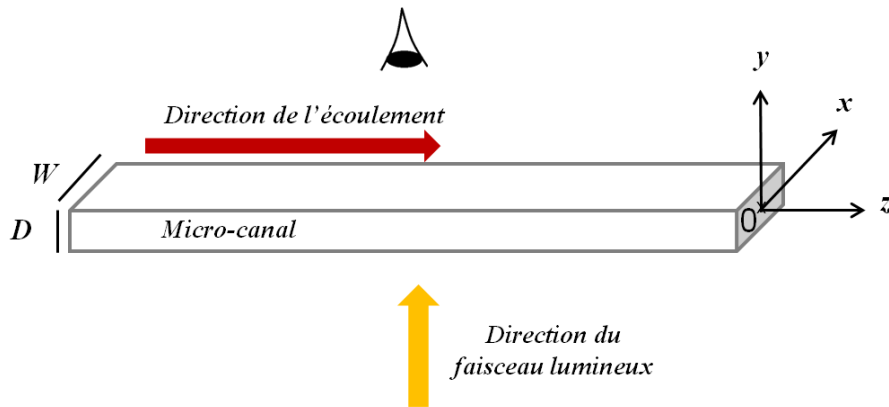


FIGURE 3.0.1: **Géométrie et notations.**

3.1 Profils de vitesse : validation et optimisation de la technique de *dual-slit*

Comme cela a été expliqué précédemment (Section 1.3.1), nous avons choisi une méthode de corrélation temporelle, la *dual-slit*, pour mesurer la vitesse des globules rouges dans nos micro-canaux. Dans le chapitre 1 (section 1.3.1.4) nous avons souligné le fait que dans un micro-canal les globules rouges sont positionnés à différentes profondeurs et y circulent à des vitesses différentes. En conséquence, la signification physique de la vitesse mesurée par *dual-slit* n'est pas évidente et n'a pas été clarifiée dans la littérature. Afin d'éclaircir cette problématique, notre but a été de déterminer la relation entre la vitesse mesurée par *dual-slit* et les vitesses caractéristiques de l'écoulement (vitesse maximale, vitesse moyenne, etc.). Pour cela, la *dual-slit* a été d'abord optimisée en utilisant des séquences d'images de synthèse qui représentent l'écoulement de globules rouges dans la profondeur du canal, c'est-à-dire dans le plan inaccessible à l'expérimentateur. Ainsi, tous les paramètres caractérisant l'écoulement des globules rouges, y compris leur profil de vitesse dans la direction parallèle au faisceau de lumière incidente, sont maîtrisés. Les résultats obtenus en appliquant la *dual-slit* à ces images de synthèse ont ensuite été validés par des expériences conduites *in vitro*.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Microvascular Research*, reproduite ci-après.



Regular Article

Velocimetry of red blood cells in microvessels by the dual-slit method: Effect of velocity gradients

Sophie Roman, Sylvie Lorthois*, Paul Duru, Frédéric Risso

Université de Toulouse, INPT, UPS, IMFT (Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse), Allée Camille Soula, F-31400 Toulouse, France
CNRS, IMFT (Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse), Allée Camille Soula, F-31400 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 26 August 2012

Available online 4 September 2012

ABSTRACT

The dual-slit is a photometric technique used for the measurement of red blood cell (RBC) velocity in microvessels. Two photometric windows (slits) are positioned along the vessel. Because the light is modulated by the RBCs flowing through the microvessel, a time dependent signal is captured for each window. A time delay between the two signals is obtained by temporal cross correlation, and is used to deduce a velocity, knowing the distance between the two slits. Despite its wide use in the field of microvascular research, the velocity actually measured by this technique has not yet been unambiguously related to a relevant velocity scale of the flow (e.g. mean or maximal velocity) or to the blood flow rate. This is due to a lack of fundamental understanding of the measurement and also because such a relationship is crucially dependent on the non-uniform velocity distribution of RBCs in the direction parallel to the light beam, which is generally unknown.

The aim of the present work is to clarify the physical significance of the velocity measured by the dual-slit technique. For that purpose, dual-slit measurements were performed on computer-generated image sequences of RBCs flowing in microvessels, which allowed all the parameters related to this technique to be precisely controlled. A parametric study determined the range of optimal parameters for the implementation of the dual-slit technique. In this range, it was shown that, whatever the parameters governing the flow, the measured velocity was the maximal RBC velocity found in the direction parallel to the light beam.

This finding was then verified by working with image sequences of flowing RBCs acquired in PDMS micro-systems *in vitro*. Besides confirming the results and physical understanding gained from the study with computer generated images, this *in vitro* study showed that the profile of RBC maximal velocity across the channel was blunter than a parabolic profile, and exhibited a non-zero sliding velocity at the channel walls.

Overall, the present work demonstrates the robustness and high accuracy of the optimized dual-slit technique in various flow conditions, especially at high hematocrit, and discusses its potential for applications *in vivo*.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Oxygen and nutrient delivery to living tissues, and also metabolic waste removal, are essentially determined by the dynamics of blood flow in microvascular networks involving vessels of diameters ranging from about 4 μm to 100 μm . In these vessels, measuring the velocity distribution of red blood cells (RBCs), and *a fortiori* the blood flow rate, is still a challenge for several reasons. Firstly, the size of normal human RBCs, which have a biconcave discoid shape, with a largest diameter of about 8 μm and a thickness of about 2 μm (Popel and Johnson, 2005), is not negligible compared to the vessel diameter. Secondly, the hematocrit, *i.e.* the RBC volume fraction in a given

microvessel, can reach values as large as 0.8, (Pries et al., 1990). Because of the large hematocrits and strong confinement, dynamical effects induced by RBCs (deformation, hydrodynamic interactions with other RBCs or with the vessel wall) play an important role in microvascular flows. These effects induce non-linear complex bio-rheological behavior, including RBC aggregation (Pries et al., 1990; Sherwood et al., 2012). In particular, the shapes of velocity and hematocrit profiles are unknown.

Consequently, the development of a reliable way to measure both velocity profiles and blood flow rate in microvessels has been the topic of a great deal of research. Several groups have aimed to adapt modern techniques that have been developed to measure velocity fields on single-phase flows in the field of microfluidics: micro-PTV (Particle Tracking Velocimetry), micro-PIV (Particle Image Velocimetry) and confocal micro-PIV. But, so far, the use of these techniques to measure velocities of RBCs and plasma flow *in vitro* have been limited to large

* Corresponding author at: CNRS, IMFT (Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse), Allée Camille Soula, F-31400 Toulouse, France. Fax: +33 5 61 28 59 93.

E-mail address: lorthois@imft.fr (S. Lorthois).

microchannels (100 μm diameter) and moderately concentrated RBC suspensions (up to 20% v/v) (Lima et al., 2006; Sherwood et al., 2012; Sugii et al., 2005), while smaller channel sizes ($\sim 40 \mu\text{m}$) and larger hematocrit (up to 60%) have been reached in a study focusing on the velocity profiles of fluorescent exogenous tracers (Long et al., 2004).

Other groups have worked on improving the temporal or spatial cross-correlation techniques classically used in microvascular research (Source et al., 2005). In this context, one of the most popular methods for measuring blood flow at the scale of microvessels is the dual-slit (or double-slit) technique. Based on temporal correlation, this technique was introduced by Wayland and Johnson (1967). It consists in transilluminating the vessel of interest and using two photosensors (photodiodes or regions of interest in a digitized image of the vessel) separated by a known distance, L_s , along the vessel axis. The time modulation of the light intensity is recorded at both positions. A cross correlation velocity, $V_{ds} = L_s/T_{max}$, is obtained, where T_{max} is the time delay for which the cross-correlation between the two signals is maximum.

From its first introduction by Wayland and Johnson, methodological improvements regarding either the fundamental understanding of the technique or its hardware implementation have never ceased (Wayland and Johnson (1967), Gaetgens et al. (1969), Gaetgens et al. (1970b), Wayland (1973), Baker and Wayland (1974), Silva and Intaglietta (1974), Lee et al. (1983), Pittman and Ellsworth (1986), Lee and Duling (1989), and Sapuppo et al. (2007)). In its original version, the dual-slit technique was restricted to capillary vessels, where individual RBCs or trains of RBCs circulate in single file at the same velocity, which can then be measured straightforwardly by temporal correlation.

However, within larger vessels, RBCs are positioned at different depths and thus move at different velocities. Therefore, they do not contribute in the same manner to the modulation of the light signal received by the two photodiodes. Baker and Wayland (1974), suggested that the cross-correlation velocity V_{ds} measured by the dual-slit for each transverse position (x coordinate) in the channel, should be related to the flow velocity profile by

$$V_{ds}(x) = \frac{\int_{-D/2}^{D/2} H(x, y) \cdot u(x, y)^2 dy}{\int_{-D/2}^{D/2} H(x, y) \cdot u(x, y) dy}, \quad (1)$$

where y is the coordinate on the axis parallel to the incident light beam, D is the channel depth, and $u(x, y)$ and $H(x, y)$ are the RBC velocity and hematocrit profiles respectively. However, the right-hand side of this equation corresponds to the dynamic average velocity of the RBCs, *i.e.* the average velocity of the RBCs flowing through a given location during a finite time (Parthasarathi et al., 1999). In contrast, the cross correlation time delay T_{max} used for calculating the left-hand-side term represents a unique time shift for which the photometric signals from the two regions have the best match (Lee and Duling, 1989). To the best of our knowledge, despite theoretical work on the influence of flow dispersion (*i.e.* the fact that the RBCs do not all move at the same velocity) in the study of microvascular flows by the dual-slit technique (Lee and Duling, 1989), the equality between the two terms of Eq. (1) (*i.e.* the cross-correlation velocity V_{ds} and the dynamic average defined above) has never been proved. Consequently, the physical significance of the empirically derived conversion factor usually used to relate the measured velocity to the mean velocity (and, finally, to the flow rate) is still an open question. In particular, the influence of the parameters characterizing the technique (size of the slits, distance between the slits, acquisition frequency, duration of the sequence) on the measured velocity, and their consequences on the conversion factor, are still largely

unknown despite some works emphasizing the importance of the distance between slits (Lee and Duling, 1989; Silva and Intaglietta, 1974) and the width of the slits (Baker and Wayland, 1974; Pittman and Ellsworth, 1986). Moreover, the influence of the bluntness of the RBC velocity profile has also been highlighted (Pittman and Ellsworth, 1986).

In spite of these uncertainties, the dual-slit technique for *in vitro* (Sakai et al., 2009) or *in vivo* (Ong et al., 2010; Salazar Vazquez et al., 2010; Villela et al., 2009) investigations of blood microcirculation is still of interest in practice. Recently, Sapuppo et al. (2007) developed and characterized an improved real-time automated measurement system based on the dual-slit methodology. This measurement system has been calibrated by using a rotating semitransparent wheel with a surface textured to simulate typical images of blood vessels. As in Lee et al. (1983), the measured tangential velocity was found to be proportional to the radial position of the slits, as expected. Nevertheless, this calibration does not evaluate the influence of a non-uniform velocity distribution on the cross-correlation velocity V_{ds} measured by the dual-slit.

The aims of the present paper are therefore:

- To determine the relationship between the cross-correlation velocity obtained by the dual-slit technique and the actual characteristic velocities of the flow (*e.g.* mean velocity, maximum velocity or dynamic averaged velocity).
- To determine an optimal set of parameters (slit size, distance L_s between the slits, acquisition frequency, duration of the sequence) for the velocity measurement.

This is challenging because, in real experiments, the RBC velocity profile in the direction parallel to the incident light beam is not known *a priori*. To overcome this difficulty, we propose to evaluate the dual-slit method here by using simplified synthetic (computer generated) image sequences of flowing RBCs. In this way, the influence of the velocity profile (varying from a Poiseuille flow to a plug flow), the hematocrit and the vessel depth can be determined. The validity of the results will then be assessed by comparison with microchannel experiments *in vitro*.

Materials and methods

In this section, the dual-slit technique and its implementation are described, and details are given on the procedure developed to generate synthetic image sequences of RBCs flowing in a channel. The main idea is to simulate images that are inaccessible to the observer during real experiments, whether *in vitro* or *in vivo*, *i.e.* images in the plane defined by both the flow and the light beam directions. In this way, all the parameters governing the flow of RBCs are known, including the velocity profile. Finally, the experimental set-up and protocols for recording *in vitro* image sequences are presented.

Note that, in the rest of the paper, the y -, x - and z -axes correspond to the directions of the incident light beam and of the transverse and longitudinal axes of the channel respectively (see Fig. 1), the flow being in the positive z direction. The synthetic images are generated in the yz -plane, as indicated in Fig. 1, whereas the experimental images are a projected view in the xz -plane, *i.e.* transverse to the light beam. The notations used are summarized in Table 1.

The dual-slit technique

As mentioned in the introduction, the dual-slit is a temporal correlation technique where the vessel under study is transilluminated and two photosensors are positioned along the vessel axis (Oz), separated by a known distance L_s . Note that all distances, including L_s , are integers expressed in pixel units. In our case, the photosensors are rectangular regions of interest (slits) on a digital image of the vessel.

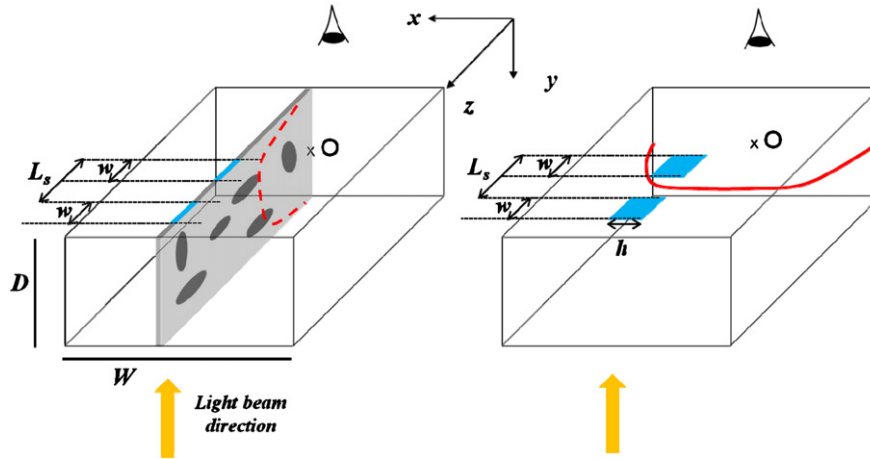


Fig. 1. Geometry and notations. The two slits are schematized in blue. In the case of synthetic image sequences (left), the flowing particles, *i.e.* a simplified representation of RBCs, are in a single plane defined by the flow and light beam directions. In consequence, the slit height h is fixed to 1 pixel. In this plane, the velocity profile is schematized by a dashed red line. In contrast, in an *in vitro* experiment (right), the experimental images provide a projected view in a plane perpendicular to the light beam. The velocity profile at mid-depth of the channel is schematized by a solid red line.

In each slit, light fluctuations are produced by the passage of the RBCs flowing through the vessel (Wayland and Johnson, 1967). The light intensity modulation with time, *i.e.* the sum of gray levels in the slit at each time step, is recorded at both positions with a sampling rate F during a time period T_{acq} . The number of images in a sequence is therefore $M = T_{acq} \times F$. The two slits have a width w in the z direction and a height h in the x direction (see Fig. 1), with the upper left corner of the first slit positioned at (x_s, z_s) pixels, and that of the second slit at $(x_s, z_s + L_s)$. The upstream signal is thus given by

$$S1(n) = \sum_{x_i=x_s}^{x_s+h-1} \sum_{z_i=z_s}^{z_s+w-1} G(x_i, z_i, n), \quad (2)$$

Table 1
Nomenclature.

Axes	
Ox	Channel transverse axis
Oy	Axis parallel to the light beam
Oz	Channel longitudinal axis
Parameters governing the flow of RBCs	
B	Bluntness parameter (velocity profile shape)
D	Channel depth (μm)
H	Hematocrit
H_D	Feed hematocrit
V_{max}	Velocity at the center of the channel ($\mu\text{m/s}$)
V_{mean}	Mean velocity of the flow ($\mu\text{m/s}$)
W	Channel width (μm)
L_{part}	Characteristic size of the particles (pixels)
Parameters used for the implementation of the dual-slit technique	
δ	Spatial calibration (pixel/ μm)
D_{acq}	Maximum displacement of a particle during the entire sequence (pixels)
D_{im}	Maximum displacement of a particle from one image to the next in the sequence (pixels)
F	Frame rate (fps)
L_p	Distance between two pairs of slits (pixels)
L_s	Distance between the two slits (pixels)
M	Number of images
N	Number of pairs of slits
T_{acq}	Acquisition time (s)
w, h	Slit width and height (pixels)
Output parameters	
T	Time delay between the two signals
T_{max}	Time delay that maximizes the cross-correlation
V_{ds}	Velocity measured by the dual-slit technique
Others parameters	
C_{S1S2}	Cross-correlation between $S1$ and $S2$ signals
$G(x, z)$	Gray level value at position (x, z) of an image
$S1, S2$	Photometric signals, upstream and downstream

where $G(x_i, z_i, n)$ is the gray level value at position (x_i, z_i) on the n^{th} image of the sequence, which corresponds to time $t = n/F$.

Similarly, the downstream signal is

$$S2(n) = \sum_{x_i=x_s}^{x_s+h-1} \sum_{z_i=z_s}^{z_s+w-1} G(x_i, z_i + L_s, n). \quad (3)$$

The separation between the slits causes $S2$ to be delayed with respect to $S1$. The cross-correlation between the two signals, C_{S1S2} , is calculated on the entire image sequence for every frame delay

$$C_{S1S2}(m) = \frac{\sum_{n=1}^M (S1(n) - \overline{S1}) \times (S2(n+m) - \overline{S2})}{\left(\frac{1}{M} \sqrt{\sum_{n=1}^M (S1(n) - \overline{S1})^2} \right) \left(\frac{1}{M} \sqrt{\sum_{n=1}^M (S2(n) - \overline{S2})^2} \right)}, m \in [0, M-1], \quad (4)$$

where

$$\overline{S1} = \frac{1}{M} \sum_{n=1}^M S1(n), \quad (5)$$

and

$$\overline{S2} = \frac{1}{M} \sum_{n=1}^M S2(n). \quad (6)$$

The corresponding time delay is $T = m/F$.

In the above expressions, the correlation is calculated over an entire image sequence, as opposed to individual events. Thus, during such a sequence, a significant number of particles are involved and the velocities of all these particles participate in the modulation of the signal. The cross-correlation function has a maximum for a time delay T_{max} , which represents the most probable delay between the two signals. The cross-correlation velocity is then obtained as: $V_{ds} = L_s / (\delta \times T_{max})$, where δ is the spatial calibration of the images (expressed in pixels/ μm) and L_s is in pixels.

If the number of particles passing through the slits during the acquisition is not sufficient (for example when V_{max} or H is small), there may be a loss of correlation (see [Dual-slit technique applied to sequences of synthetic images](#) section). In this case, the statistical convergence of the process can be improved by repeating the V_{ds} measurement N times. For that purpose, N pairs of slits are

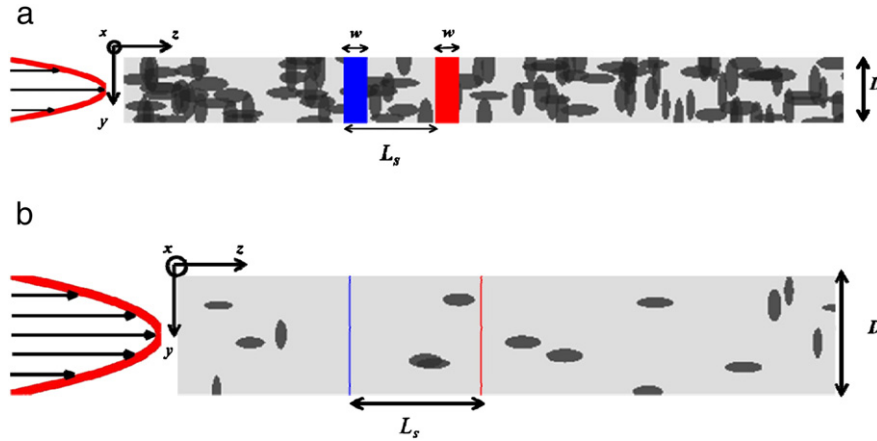


Fig. 2. Typical synthetic images of RBC flow. a) Parameters governing the flow of RBCs: $D = 15 \mu\text{m}$, $H = 0.5$, $B = 0.5$, and parameters used for the implementation of the dual-slit technique: $w = 27$ pixels, $L_s = 60$ pixels. b) Parameters governing the flow of RBCs: $D = 30 \mu\text{m}$, $H = 0.2$, $B = 1$, and parameters used for the implementation of the dual-slit technique: $w = 1$ pixel, $L_s = 100$ pixels.

considered, each separated by L_p pixels along the z -axis. Typically $L_p = 48$, corresponding to 2–3 RBC sizes. For each pair of slits, the time delay that maximizes the correlation is determined. Among the delays thus obtained, the one that maximizes the magnitude of the corresponding correlation is kept for the calculation of V_{ds} .¹

Application of the dual-slit technique to sequences of synthetic images

The dual-slit technique was first investigated using simplified synthetic image sequences of RBC flows. These sequences were generated on a computer by simulating the flow of particles (representing the RBCs) in a single plane defined by the flow and light beam directions. In this case, the height of the slit, which was in the direction perpendicular to the plane defined above, was set to 1 pixel (see Fig. 1). The following assumptions were made: the particles were rigid, there were no interactions between them, and there were no hydrodynamic interactions. Thus, the RBC velocity profile did not result from these interactions but was imposed, varying from a parabolic profile to a plug flow. In addition, the hematocrit distribution was assumed to be uniform. In these conditions, all the parameters governing the flow of RBCs and used for the implementation of the dual-slit technique were known, which allowed their influence on V_{ds} to be studied.

RBC flow simulation

To generate the first image of a sequence, the first step was to randomly distribute the centers of mass of a given number of particles in the yz -plane, see Fig. 1. The channel depth, D ranged from 10 to $30 \mu\text{m}$, i.e. the typical range of blood vessel dimensions for which the use of the dual-slit technique is the most challenging. The shape of the particles was chosen to be elliptic, with major axes randomly chosen between $7 \mu\text{m}$ and $9 \mu\text{m}$, and minor axes between 2 and $3 \mu\text{m}$, as suggested by our experimental observations. The spatial calibration, δ , was 3 pixels/ μm , corresponding to the resolution of the experimental device (see Application of the dual-slit technique to *in vitro* experiments section). The major axes of the particles were randomly oriented either along the y -axis or the z -axis. Superimposition of two or more particles was not prevented. The resulting hematocrit, H , was defined as the ratio between the area occupied by the particles and the total area of the channel in synthetic images. It typically increased with the number of particles considered and could range

between 0.1 and 0.9, which corresponds to the range measured in the microcirculation (Pries et al., 1990).

The second step was to determine the gray level value at each point $G(y, z)$ of the image. To simulate the light signal with pixel values ranging from 0 to 255, the background gray level and the gray level of particles were arbitrarily chosen as 240 and 150 respectively, i.e. a ratio of 5/8. When two particles were superimposed, the gray level of their intersection region was once again multiplied by 5/8. The gray level decreased again with the same power law if more particles were superimposed. Two typical images are shown in Fig. 2.

The whole image sequence was generated by translating each particle by a given number of pixels along the z axis from one image to another, depending on the y position of its center of mass and on the imposed velocity profile. In the microcirculation, blunted velocity profiles have been described by Pittman and Ellsworth (1986) and, for the present case of a square microchannel, can be written:

$$v(x=0, y) = V_{\max} \left(1 - B \left(\frac{y}{D/2} \right)^2 \right), \quad (7)$$

where the factor B varies between 0 and 1 and describes the degree of bluntness, $B = 1$ corresponding to the familiar Poiseuille parabolic velocity distribution and $B = 0$ to a plug flow. The maximal velocity V_{\max} was chosen in the range of velocities measured in small vessels *in vivo*: about 10 mm/s in arterioles, 0.2 mm/s in capillaries and from 0.2 to 2.5 mm/s in venules (Popel and Johnson, 2005). Note that, due to the velocity distribution, particles did not all travel the same distance between two images. The total length of the channel and the length of the measurement section (typically 500 pixels) were chosen to ensure that no part of the latter became empty. The gray levels on each image of the sequence were then determined using the same rules as above.

Implementation of dual-slit technique on synthetic images

The dual-slit method was applied for various distances L_s between the slits (from 1 to 300 pixels) and different slit widths w (between 1 and 48 pixels). As seen previously, the slit height h was fixed at 1 pixel. As the images were generated in the yz -plane, the values $G(z)$ for the calculation of the signals $S1(n)$ and $S2(n)$ (see Eqs. (2) and (3)) were simply chosen as the sum of pixels in the y direction at a given z position.

This was, of course, a crude approximation of the light scattering leading to a decrease in light intensity transmitted through the microchannel (which, as remarkably demonstrated by Pries et al. (1983) consists of two contributions, Beer–Lambert like attenuation

¹ This method is easily applicable when the slits are regions of interest in digital image sequences of the flow. If the slits were photodiodes or phototransistors, several pairs of photodiodes positioned along the channel would need to be used.

by the hemoglobin contained the RBCs and diffusion by the RBC interfaces). The important point is that, in the model used here, light modulation at a given position in the image plane resulted from the motion of RBCs moving at different velocities in the depth of the channel. We assumed that this was the main physical ingredient to be taken into account in the image sequence generation. This was subsequently confirmed by the consistent set of results obtained.

Application of the dual-slit technique to *in vitro* experiments

The dual-slit technique was applied to *in vitro* image sequences of flowing RBCs. A microfluidic system mimicking blood microvessels was used with neutrally buoyant suspensions of washed human RBCs.

Microchannels

The microchannels were 8-mm-long segments of square cross-section, $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ or $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, molded in Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) with rectangular distribution and drainage channels (15-mm-long, $100\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ and $50\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) placed upstream and downstream. The well-known technique of soft lithography (McDonald and Whitesides, 2002) was used to make the microchannels. Briefly, a glass-chrome photomask was used to create the positive relief of the microchannel in a photoresist (SU8), which was then used as a master in the PDMS molding process (McDonald et al., 2000; Shevkoplyas et al., 2003). A cast of the channels was obtained by pouring transparent liquid PDMS (Silicone Elastomer, Sylgard) onto the master, baking it (1 h, 65°), and removing it from the wafer. Holes for the fluidics interconnections were made in the PDMS, which was then cleaned with detergent (Decon 90) in an ultrasonic bath. Another cast of PDMS was prepared by pouring liquid PDMS into a flat mold and partially curing it (30–40 min, 55°C) until it became hard enough to be handled and peeled off the mold (Eddings et al., 2008). The two PDMS layers were then assembled and heated for 15 min at 110° until they were securely bonded.

Fluidics

A precision pressure control method (MicroFluidics Control System 8C, Fluigent, France) was used. The pressure drop was typically in the 10 to 50 mbar range. Assuming that the narrower part of the microchannels, i.e. the part with the square cross section of $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ or $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, was mainly responsible for the pressure drop, the applied pressure gradient between the inlet and outlet of this square microchannel was in the range ~ 0.8 – 4.5 mbar/mm. This pressure-driven flow ensured good stability over long periods, and

very short response times when the set pressure drop was changed. Small reservoirs (dispense tips: Nordson EFD) containing the suspension under study or GASP solution (see below) were connected to the input and output channel, respectively. These reservoirs were directly connected to pressure controllers by lock rings on the reservoirs and soft tubing.

RBC suspensions

Blood ($\sim 50\ \mu\text{L}$ samples) was collected from healthy volunteers by finger-stick and immediately diluted in a phosphate buffered saline (PBS) solution (1.3 mM NaH_2PO_4 , 9 mM Na_2HPO_4 , 140 mM NaCl, pH 7.4) containing 1.5 mg/mL EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Fluka) for anticoagulation. RBCs were washed by successive centrifugation and re-suspension of the pellet in GASP buffer (PBS containing 5.5 mM glucose and 4% Bovine Serum Albumin (Eurobio)).

In order to avoid RBC sedimentation, the final suspending medium had the same density as RBCs, i.e. 1.09 to 1.11 g/mL. To that end, a stock solution containing 90% Optiprep (Axis-Shield) and 10% GASP $\times 10$ (GASP 10 times concentrated) was prepared. It was then mixed with GASP after the proportions needed to obtain the desired density (1.1 g/mL), i.e. 35% of stock solution and 65% of GASP, had been determined. The final cell pellet was diluted at the desired concentration (feed hematocrit) in this last solution.

Imaging

The imaging system consisted of a Leica DMRXA2 microscope with $\times 20$ ($\text{NA} = 0.4$) long-working-distance objective. Image acquisition was performed by a high-speed digital camera (APX, with a 1024×1024 pixel CMOS sensor and 10 bit signal dynamics). The channel depth ($10\ \mu\text{m}$ or $20\ \mu\text{m}$) was less than the depth of field of the optical setup. To obtain usable signals, it was observed that the particles had to travel less than one pixel per frame (see Dual-slit technique applied to sequences of synthetic images section), so the sampling rate F was chosen according to the velocity of the flow. To that end, two successive images of the flow were considered. For a given F , the displacement of particles – or particle groups – was evaluated and F was adapted if necessary. The acquisition frequency could vary from 500 to 10,000 frames per second (fps). The exposure time of each image was set to $1/F$. The spatial calibration δ of the images obtained was about 3 pixels per μm (see Fig. 3).

RBC velocity measurement by dual-slit technique

The dual-slit technique was applied for each position x on the channel. First, the channel edges were detected on the images,

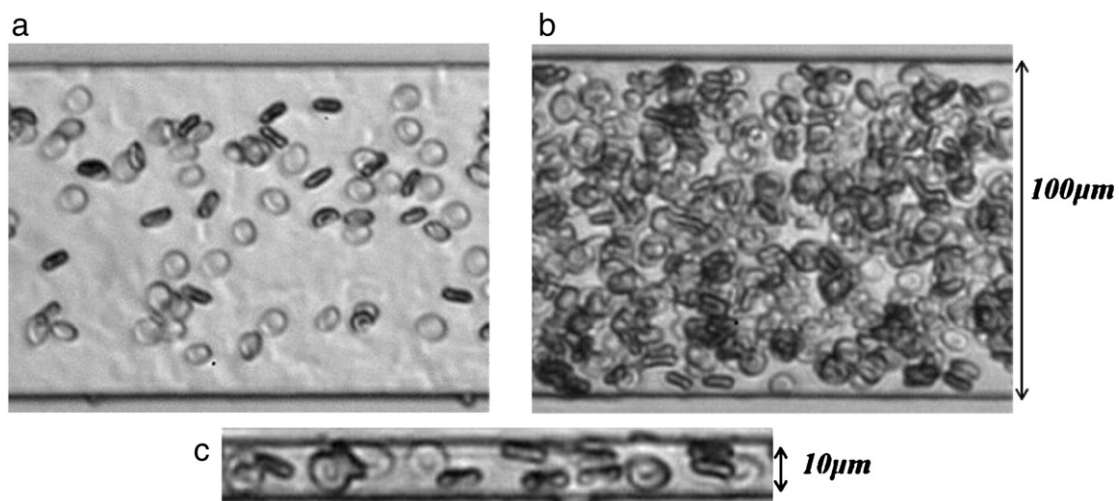


Fig. 3. Typical *in vitro* images of RBC flow. a) $100\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ channel, feed hematocrit: $H_D = 0.1$, $F = 2000$ fps. b) $100\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ channel, $H_D = 0.45$, $F = 1000$ fps. c) $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ channel, $H_D = 0.4$, $F = 1000$ fps.

which allowed the spatial calibration of the images of the sequence to be determined, knowing the channel width in μm .

The dual-slit technique was then applied for various distances L_s between the two slits: from 1 to 300 pixels.

Results

The influence of the parameters characterizing the dual-slit technique (size of the slits, distance between the slits, acquisition frequency, and duration of the sequence) on the measured velocity was studied first (Optimization in the case of a reference flow section). Because many parameters are involved in velocity measurement by the dual-slit technique, a reference case was considered, in which synthetic image sequences were generated using fixed flow parameters representative of a typical experimental situation ($V_{\text{max}} = V_{\text{ref}} = 100 \mu\text{m/s}$, $D = D_{\text{ref}} = 20 \mu\text{m}$, $H = H_{\text{ref}} = 0.5$ and $B = B_{\text{ref}} = 1$). Thus a set of optimal parameters was sought, for which the measured velocity had a physical significance. Once such an optimal set of parameters had been determined in the reference case, the influence of the other parameters, i.e. parameters related to the flow, could be investigated, once again using synthetic image sequences (Influence of flow conditions section). Finally, the results obtained were validated using image sequences recorded *in vitro* (Dual-slit technique applied to *in vitro* image sequences section).

Dual-slit technique applied to sequences of synthetic images

Optimization in the case of a reference flow

Effect of L_s . Several studies, including those of Lee and Duling (1989) and Silva and Intaglietta (1974), suggest that the velocity measured by the dual-slit technique is highly dependent on the spacing, L_s , between the slits. Thus, the influence of L_s on V_{ds} was studied first. L_s was varied from 1 to 300 pixels, which corresponds to more than 10 times the particle size. The frame rate and acquisition time were both set to large values ($F = 5000 \text{ fps}$ and $T_{\text{acq}} = 30 \text{ s}$, corresponding to $M = 150000$ images) in order to minimize their influence.

For the rest of the paper, it is useful to introduce dimensionless quantities in order to compare the results obtained with different sets of parameters. The dimensionless quantities corresponding to the above dimensional variables (L_s and V_{ds}) are denoted with bars (\bar{L}_s and \bar{V}_{ds}). As is usual in the field of fluid mechanics, the velocities were non-dimensionalized by V_{max} , the velocity at the center of the channel, which provided a natural characteristic scale for the velocities ($\bar{V}_{ds} = V_{ds}/V_{\text{max}}$). The characteristic time scale was chosen as the minimum transit time of the flowing particles through each slit. This time scale was equal to $L_{\text{part}} + w - 1/(V_{\text{max}} \times \delta)$, where the reference particle size L_{part} was 24 pixels, corresponding to the average length of the major axis of the particles. This was indeed the only relevant time scale that was independent of the slit separation distance, the effect of which was to be studied. The characteristic length scale was then consistently chosen as the previous time scale multiplied by the velocity characteristic scale, i.e. $(L_{\text{part}} + w - 1)/\delta$ (μm). Finally, the dimensionless slit separation distance was $\bar{L}_s = L_s/(L_{\text{part}} + w - 1)$.

The results are shown on Fig. 4. The red curve demonstrates that, when \bar{L}_s increases, \bar{V}_{ds} tends progressively towards 1. In other words, the cross correlation velocity measured by the dual-slit technique reaches the velocity at the center of the channel when L_s becomes sufficiently large. Therefore, in the case of large slit separations, i.e. typically larger than 5 times the size of a single particle, the measured velocity directly corresponds to the maximum velocity in the direction parallel to the incident light beam. For smaller values of L_s , the velocity value measured is smaller.

In fact, when the distance between the slits becomes sufficiently large, the photometric patterns representative of the slow particles become decorrelated between the two slits, leading to a decrease in

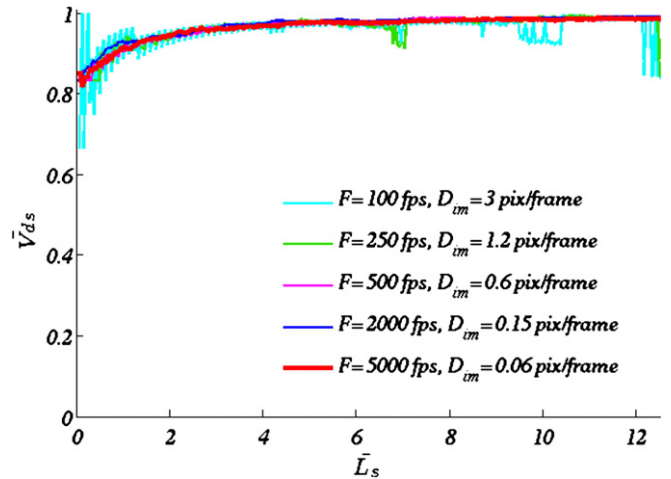


Fig. 4. Normalized dual-slit velocity versus the normalized distance between the two slits for the reference flow parameters ($H_{\text{ref}} = 0.5$, $D_{\text{ref}} = 20 \mu\text{m}$, $V_{\text{ref}} = 100 \mu\text{m/s}$, $B_{\text{ref}} = 1$). The results are shown for five frame rates. In all cases, $T_{\text{acq}} = 30 \text{ s}$ and $w = 1 \text{ pixel}$.

T_{max} and an increase in the measured velocity, which progressively approaches the velocity of the fastest particles (V_{max}). In contrast, for small distances between the slits, every particle, the slowest as well as the fastest ones, contributes to the cross correlation signal. Compared to the case where the slits are sufficiently distant, this induces an overestimation of the time shift for which the photometric signals from the two regions have the best match, and leads to an underestimated value of the velocity.

When F and T_{acq} were increased further, the above results remained unchanged (data not shown), demonstrating that the chosen values were large enough and did not affect the measurement.

Influence of frame rate. The results obtained for smaller frame rates (100 to 2000 fps) are also shown on Fig. 4. For these values of F , fluctuations occurred around the velocity measured at high frame rates (red curve). Their amplitude decreased with both increasing frame rate and increasing slit separation distance. This was because the relative uncertainty on T_{max} ($= 0.5/(FT_{\text{max}})$) and therefore on the measured velocity L_s/T_{max} , increased when the temporal resolution decreased (smaller F) and/or when the slit separation L_s decreased (smaller T_{max}). This effect is similar to peak-locking in measurements performed by Particle Image Velocimetry (PIV), a spatial correlation technique, where the effect appears when the displacement of particles is small compared to the size of a pixel (Huang et al., 1997; Raffel et al., 2007).

Of course, the value of the temporal resolution for which these fluctuations disappear depends on the flow velocity. In the case illustrated in Fig. 4, where $V_{\text{max}} = 100 \mu\text{m/s}$, fluctuations typically disappeared above $F = 2000 \text{ fps}$. An important question is therefore how to choose an adequate value of F when performing a velocity measurement by the dual-slit technique. We propose an operational criterion, based on the maximum displacement of particles from one image to the next in the sequence. This parameter, denoted D_{im} , is equal to $V_{\text{max}}\delta/F$ and is easily accessible in experiments *in vitro* or *in vivo*. In the case of the reference flow, D_{im} must be smaller than or equal to 0.6 pixels/frame to avoid fluctuations. When $0.6 < D_{\text{im}} < 1.2$ (pixels/frame), fluctuations are present for small values of L_s but they do not interfere with the measurement because they vanish for large values of L_s . As a result, V_{ds} still tends towards V_{max} (Fig. 4, green curve: $D_{\text{im}} = 1.2 \text{ pixels/frame}$). However, when D_{im} becomes too large ($D_{\text{im}} > 1.2 \text{ pixels/frame}$ in this case), in addition to a large oscillation amplitude, the evolution of the measured velocity with slit separation exhibits sudden jumps toward smaller values. These sudden jumps are the signature of insufficient statistical convergence

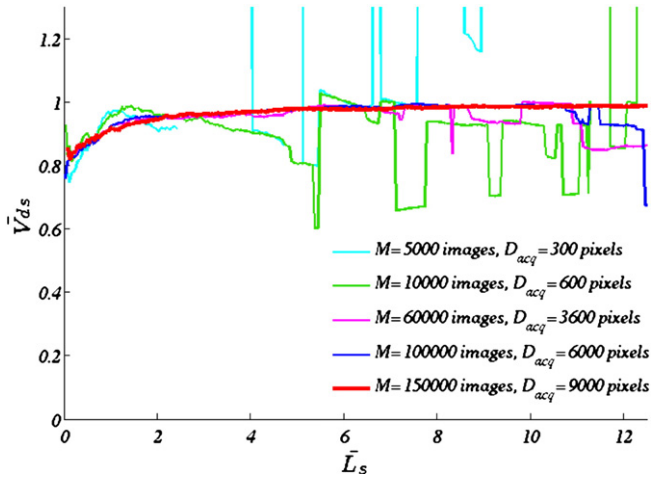


Fig. 5. Normalized dual-slit velocity versus the normalized distance between the two slits for the reference flow parameters ($H_{ref}=0.5$, $D_{ref}=20\text{ }\mu\text{m}$, $V_{ref}=100\text{ }\mu\text{m/s}$, $B_{ref}=1$). The results are shown for 5 values of M . In all cases, $F=5000\text{ fps}$, $D_{im}=0.06\text{ pixels/frame}$, and $w=1\text{ pixel}$. Sudden jumps to infinite values (light blue curve) correspond to situations where autocorrelation dominates ($T_{max}=0$).

of the cross-correlation process (Fig. 4, light blue curve: $D_{im}=3\text{ pixels/frame}$).

Influence of acquisition time. Once a sufficiently large F , corresponding to a small D_{im} , has been chosen, the result of the cross-correlation will depend on the acquisition time or, in an equivalent fashion, on the number of images in the sequence. To illustrate this, Fig. 5 once again shows the variation of the measured velocity versus the separation between slits, with M varying from 5000 to 150,000 images. As before, when M is very high (See Fig. 5 red curve, where $M=150,000$), \bar{V}_{ds} reaches 1 when \bar{L}_s increases. No sudden jump is observed. If M is smaller, however, fewer particles are involved in the recorded signals $S1$ and $S2$. In consequence, sudden jumps are observed when \bar{L}_s increases, but, except for these jumps, \bar{V}_{ds} still converges to 1 (see Fig. 5, purple curve, $M=60,000$ images). When M becomes too small, i.e. $M \leq 10,000$ images, the measured velocities fluctuate a lot and \bar{V}_{ds} no longer reaches 1. Here, the operational criterion regarding the statistical convergence is related to the maximal displacement of particles from the first to the last image in the sequence, $D_{acq}=MD_{im}$. In the case of the reference flow, D_{acq} must be greater than 9,000 pixels to totally avoid sudden jumps (see Fig. 5, red curve), at least if the maximal separation between slits stays in a reasonable range, i.e. below 10 times the particle size. When D_{acq} decreases, the number of sudden jumps increases and, for D_{acq} below 3600, obtaining a reliable measurement of V_{max} becomes impossible.

In between ($3600 < D_{acq} < 9000$), the information extracted from the image sequence can be improved by repeating the measurement over multiple pairs of slits, see The dual-slit technique section. The effectiveness of this method is demonstrated in Fig. 6, where 15 iterations of the dual-slit were performed. By iterating the dual-slit several times (thus correlating at different locations on the channel) and choosing the best correlation, the sudden jumps disappear, leading to a smooth evolution of the measured velocity according to the slit separation distance.

This is important because, in practice, it is not always possible to record as many images as needed, depending on the experimental system. A small value of D_{im} must be chosen to avoid fluctuations. On the other hand, a large value of D_{acq} is needed to avoid losses of statistical convergence, which imposes a number of images to be

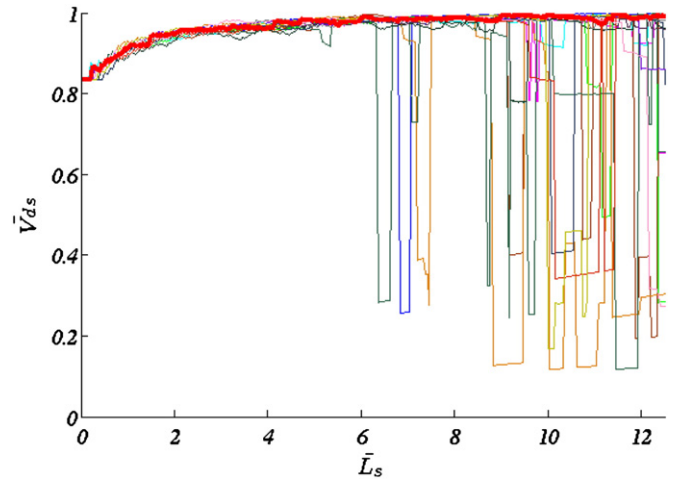


Fig. 6. Normalized dual-slit velocity versus the normalized distance between the two slits, showing the effectiveness of repeating the measurement over multiple pairs of slits. Each curve was obtained for a different longitudinal position of the first slit, 15 equi-spaced values being considered. The bold red curve was obtained, as explained in The dual-slit technique section, by choosing, among the 15 delays, the one maximizing the correlation for a given L_s . The parameters used for the implementation of the dual-slit technique were: $F=500\text{ fps}$, $M=15000$ images, $D_{im}=0.3\text{ pixels/frame}$, $D_{acq}=4500\text{ pixels}$, $w=1\text{ pixel}$, $N=15$ and $L_p=48\text{ pixels}$. The flow-governing parameters are: $V_{max}=50\text{ }\mu\text{m/s}$, $D=30\text{ }\mu\text{m}$, $H=0.53$, $B=1$.

recorded ($M=D_{acq}/D_{im}$) which may be larger than the storage capacity of the camera system.

Effect of slit width. To conclude this study of the reference case, the dual-slit technique was applied for slit widths varying from $w=1$ to $w=48\text{ pixels}$, i.e. ranging from the smallest possible width to the size of two particles. The results are shown in Fig. 7. It is noteworthy that, when w increases, the value of L_{ref} also increases. Therefore, the maximum achievable \bar{L}_s decreases. However, it has been shown previously that a large \bar{L}_s is needed for a relevant implementation of the dual-slit technique. Moreover, when w increases, the asymptotic value of one is not reached for the largest values of the slit separation distance. This demonstrates that the optimal value of w is the smallest one, i.e. a single pixel. Moreover, in this case, $L_{ref}=L_{part}$, which facilitates the interpretation of the results.

Influence of flow conditions

This section addresses the question of whether the optimal set of parameters determined above in the flow reference case remains optimal in other conditions. In particular, the influence of the flow-governing parameters is studied.

The influence of the maximal velocity can be analyzed analytically and will be addressed first. For this purpose, the flow reference case is considered, where F is fixed at any F_{ref} chosen in the optimal set, i.e. $V_{ref}\delta/F_{ref} < 0.6$. If the maximal velocity V_{ref} is multiplied by a given parameter α , maintaining a constant D_{im} requires F_{ref} to be multiplied by α also. The displacement of any particle from one image to the next in the sequence will then remain unchanged. The resulting image sequence ($V=\alpha V_{ref}$, $F=\alpha F_{ref}$) is similar to the reference image sequence ($V=V_{ref}$, $F=F_{ref}$). Thus, the evolution of the measured velocity as a function of the slit separation distance will be identical to the evolution obtained with V_{ref} and F_{ref} , as long as the other parameters are unchanged.² Of course modifying V_{ref} without simultaneously changing F involves an increase or decrease of D_{im} . If D_{im} and D_{acq} remain in the optimal range (see Table 2), the

² In particular, if the number M of images in the sequence is unchanged, the optimization parameter D_{acq} remains constant, as $D_{acq}=MD_{im}$.

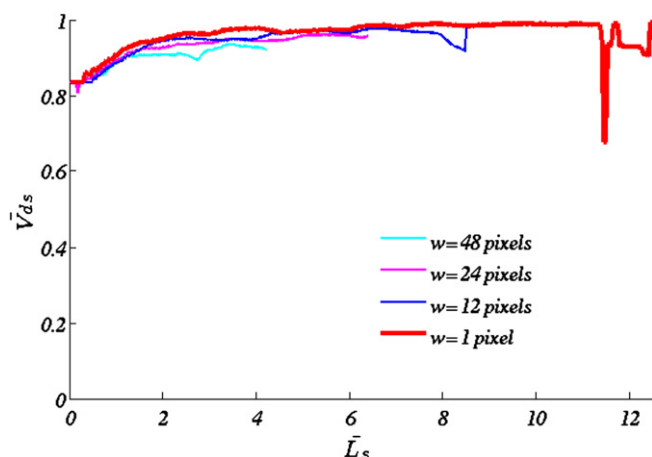


Fig. 7. Normalized dual-slit velocity versus normalized distance between the two slits for the reference flow parameters ($H_{ref}=0.5$, $D_{ref}=20\text{ }\mu\text{m}$, $V_{ref}=100\text{ }\mu\text{m/s}$, $B_{ref}=1$), showing the influence of the slit width. The parameters used for the implementation of the dual-slit technique are: $F=1000\text{ fps}$, $T_{acq}=30\text{ s}$, $D_{im}=0.3\text{ pixels/frame}$, and $D_{acq}=9000\text{ pixels}$.

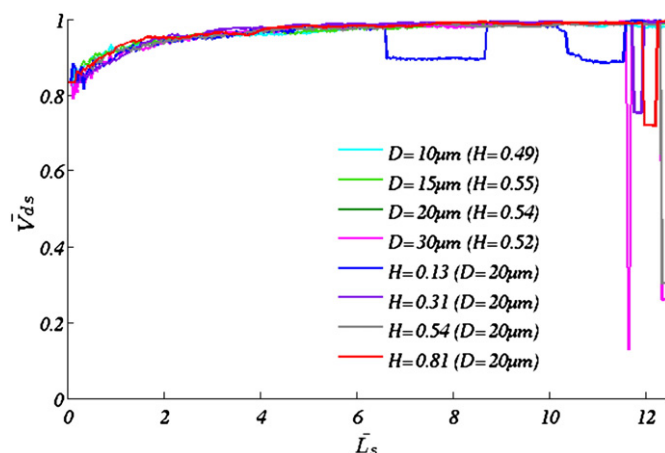


Fig. 8. Normalized dual-slit velocity versus normalized distance between the two slits, for various values of H and D . The parameters used for the implementation of the technique were: $F=1500\text{ fps}$, $M=45000\text{ images}$, and $w=1\text{ pixel}$ with the flow conditions $V_{max}=100\text{ }\mu\text{m/s}$ and $B=1$.

measurement of V_{max} by the dual-slit technique is still valid. Thus, modifying the maximal velocity is equivalent to changing the acquisition frequency, the effects of which have been described in the previous section.

In the following, the influence of the remaining parameters, i.e. channel depth, D , hematocrit, H , bluntness, B , of the velocity profile is studied, with V_{max} fixed at V_{ref} . All other parameters, except the separation distance between the two slits, are kept constant ($F=1500\text{ fps}$, $T_{acq}=30\text{ s}$, $w=1\text{ pixel}$, $\delta=3\text{ pixels}/\mu\text{m}$). With this set of parameters, $D_{im}=0.2\text{ pixels/frame}$ and $D_{acq}=9000\text{ pixels}$.

Fig. 8 shows that the influence of the slit separation distance on the measured velocity is independent of D and H . For low values of the hematocrit, however, sudden, large jumps are observed because too few particles travel through the slits, which impair the calculation of the cross-correlation (see Fig. 8, dark blue curve, where $H=0.13$). Once again, this can easily be solved by applying the method introduced in The dual-slit technique section and validated in the previous section (see Fig. 6), where the dual-slit measurement is repeated.

In contrast, Fig. 9 shows that the degree of bluntness of the velocity profile strongly influences the shape of the curve. As expected, when the velocity profile is flat ($B=0$), implying that all the particles travel at the same velocity, the measured velocity corresponds exactly to V_{max} regardless of the value of L_s . When B increases progressively, V_{ds} reaches V_{max} for larger slit separation distances because the fastest particles become relatively less numerous in the channel. Thus, the case of a parabolic profile ($B=1$), thoroughly studied in the previous section, is the most unfavorable for the implementation of the dual-slit technique.

All together, the above results demonstrate that, regardless of the flow parameters, the dual-slit technique always allows the maximal velocity in the channel to be measured, provided that the optimal conditions for implementing the technique are used and L_s is in the range of 5 to 10 particle sizes. In these conditions, summarized in Table 2, V_{max} can be measured with an error of less than 2%, which represents the intrinsic error due to the principle of the dual-slit technique.

Table 2
Operational parameters for an optimal implementation of the dual-slit.

F (fps)	M (images)	w (pixels)	L_s
$D_{im} = \frac{V_{max}\delta}{F} < 0.6$	$D_{acq} = MD_{im} \geq 9000$	$w = 1$	5 to 10 particle sizes

Dual-slit technique applied to in vitro image sequences

The case of synthetic image sequences of particle flow in microchannels has been carefully studied. However, these image sequences were generated on the basis of strong assumptions. In particular, the RBCs were considered as rigid tracers, and their interaction with each other and with the wall were not taken into account. Actual blood flows are much more complex. Moreover, the rendering of individual RBCs (shape and variations in intensity) was considerably simplified in the synthetic images. The question of whether the results obtained using sequences of synthetic images are relevant in the context of *in vitro* experiments or not is therefore examined in the present section.

First, it is useful to recall that, while synthetic images represent the channel in a plane parallel to the light beam, the experimental images of *in vitro* flows are in a plane perpendicular to the light beam (see Fig. 1).

Therefore, unlike previously, the height of the slits, h , is not set to 1 pixel. As the signals extracted from experimental images contain some noise, slightly increasing the height of the slits improves the correlation. In all that follows, the height of the slits is fixed at 3 pixels. As this value is smaller than the size of a single RBC, it is still possible to determine the velocity variations in the transverse direction of the channel.

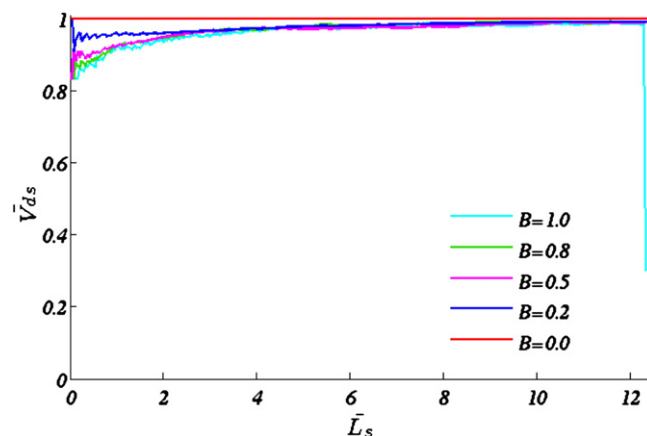


Fig. 9. Normalized dual-slit velocity versus normalized distance between the two slits for various values of B from 0 to 1. The parameters used for the implementation of the technique were: $F=1500\text{ fps}$, $M=45000\text{ images}$, and $w=1\text{ pixel}$ with the flow conditions $V_{max}=100\text{ }\mu\text{m/s}$, $D=20\text{ }\mu\text{m}$, and $H=0.5$.

Several cases are considered:

- RBCs flowing in single file in a square $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ channel at high feed hematocrit ($H_D = 0.5$),
- Flow in a larger rectangular channel ($100\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$) at lower feed hematocrit ($H_D = 0.2$),
- Flow in a square channel of the same depth (i.e. $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$) at $H_D = 0.4$.

In the first case, a flat velocity profile is expected. In the second case, in a similar experimental configuration (Lima et al., 2008), the RBC maximal velocity profile in the Ox direction was reported to be markedly blunt in the central region, mainly due to the low aspect ratio of the channel.

In all cases, images were 512 pixels long and the measurement was repeated over multiple pairs of slits ($N = 10$ and $L_p = 40$ pixels). Plots of experimental V_{ds} versus L_s with slits positioned along the centerline of the channel are shown in Figs. 10a, b and c (red curves) for the three cases studied.

In all cases, the variation of V_{ds} with the slit separation distance was very close to that already observed when using synthetic image sequences: global increase of V_{ds} with a concomitant decrease in the observed fluctuations and existence of an asymptotic regime at large separation distances. This important result demonstrates that all the main features of the influence of the slit separation distance were captured in the previous simplified analysis. Thus, in experiments *in vitro*, the highest value of the measured velocity for L_s between 5 and 10 RBC sizes can be considered as the maximal RBC velocity in the direction parallel to the light beam. Quantitatively, the measured values of the maximal velocity were 495, 542 and $1278.5\ \mu\text{m/s}$ in the three examples shown in Figs. 10a, b and c, respectively.

The corresponding transverse velocity profiles are plotted on Figs. 11a, b and c. For each measurement along the x axis, plots of V_{ds} versus L_s were examined to ensure that fluctuations or sudden jumps did not significantly affect the result. As previously, the measured velocity was chosen to be the maximum of V_{ds} values for L_s between 5 and 10 RBC sizes. As expected, a flat transverse velocity profile was obtained in the smallest channel ($B = 0.04$ by least square adjustment to Eq. (7), see Fig. 11a). In addition, in the rectangular channel, a markedly blunt profile was obtained in the central region. This result is consistent with the results obtained by Lima et al. (2008) using a micro-PIV system. However, the present analysis provides a significantly higher spatial resolution, especially near the walls. Thus, it is possible to evaluate the maximal sliding velocity of the RBCs at the channel walls ($200\ \mu\text{m/s}$ in the present case, i.e. 39% of the velocity at the channel center). Finally, in the $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ square channel, the RBC velocity profile exhibited a larger sliding velocity with quite a small bluntness parameter ($B = 0.19$ by least square adjustment to Eq. (7), see Fig. 11c).

Therefore, the dual-slit technique clearly appears to be a powerful and straightforward technique for the quantitative determination of the RBC maximal velocity profile in the transverse direction in microchannels. The useful information lies in the asymptotic value of the measured velocity (V_{ds}) for large slit separation distances.

Below, we show that additional information on the shape of the velocity profile in the direction parallel to the light beam can be extracted from the behavior of V_{ds} at small to moderate separation distances. To that end, results obtained in square channels, where identical profiles of maximal velocity can be expected in both Ox and Oy directions, are useful. In this case, it is possible to generate synthetic sequences of images for which the imposed velocity profile matched the experimental one (i.e. identical values of V_{max} and B in Eq. (7)). The behavior of the measured velocity versus the slit separation distance, with F , M , δ , H and D chosen to reproduce the experimental conditions, is represented in Figs. 10a and c (dark blue

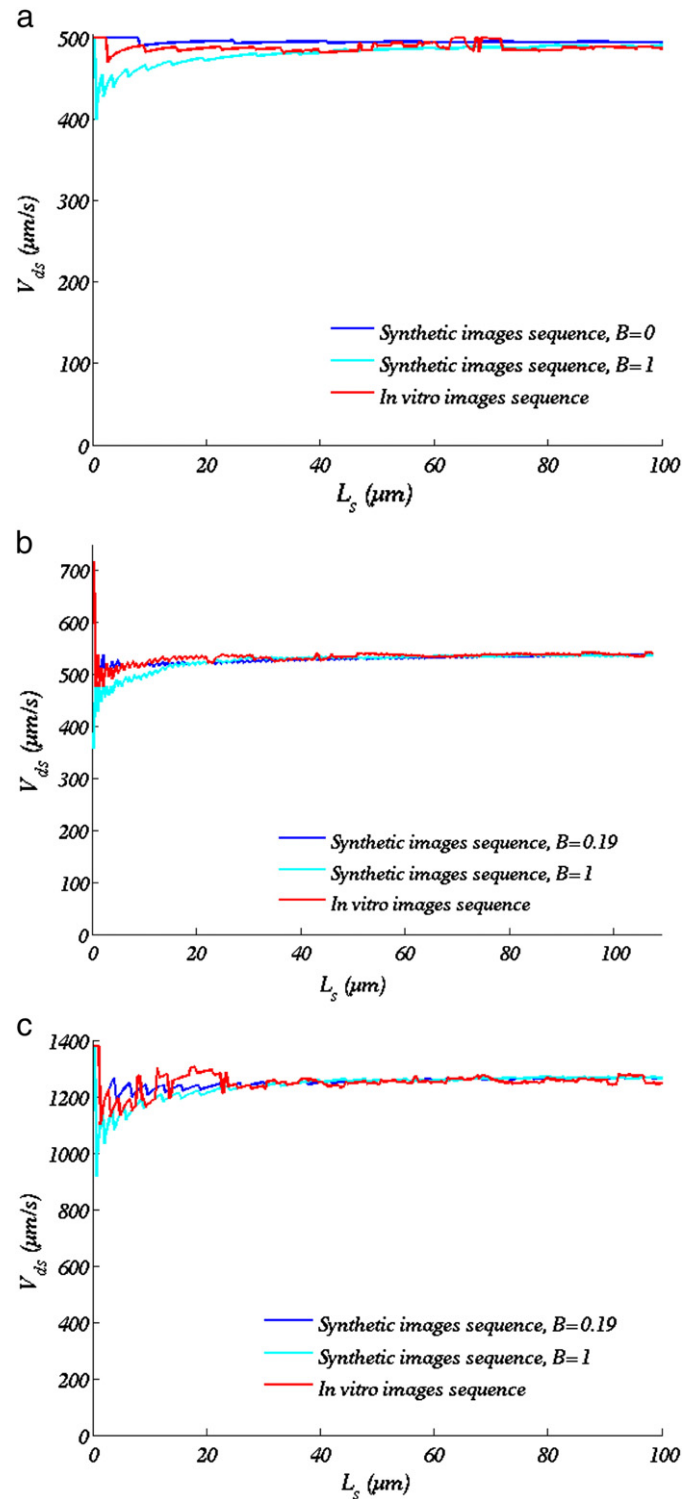


Fig. 10. Dual-slit velocity measured at the center of the channel ($x=0$) versus the distance between the two slits for sequences of *in vitro* and synthetic images. a) $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ *in vitro* channel. For the three sequences: $F = 3000$ fps, $M = 40000$ images, $H_D = 0.5$, $D = 10\ \mu\text{m}$, $\delta = 3$ pixels/ μm , $w = 1$ pixel. Moreover, *in vitro*: $\Delta P = 12$ mbar and $h = 3$ pixels. For the synthetic image sequences, $V_{max} = 495\ \mu\text{m/s}$. b) $100\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ *in vitro* channel. For the three sequences: $F = 2000$ fps, $M = 20000$ images, $H_D = 0.2$, $D = 20\ \mu\text{m}$, $\delta = 2.79$ pixels/ μm , $w = 1$ pixel. Moreover, *in vitro*: $\Delta P = 2.5$ mbar and $h = 3$ pixels. For the synthetic image sequences, $V_{max} = 542\ \mu\text{m/s}$. c) $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ *in vitro* channel. For the three sequences: $F = 4000$ fps, $M = 30000$ images, $H_D = 0.4$, $D = 20\ \mu\text{m}$, $\delta = 2.9$ pixels/ μm , $w = 1$ pixel. Moreover, *in vitro*: $\Delta P = 13.5$ mbar and $h = 3$ pixels. For the synthetic image sequence, $V_{max} = 1278.5\ \mu\text{m/s}$.

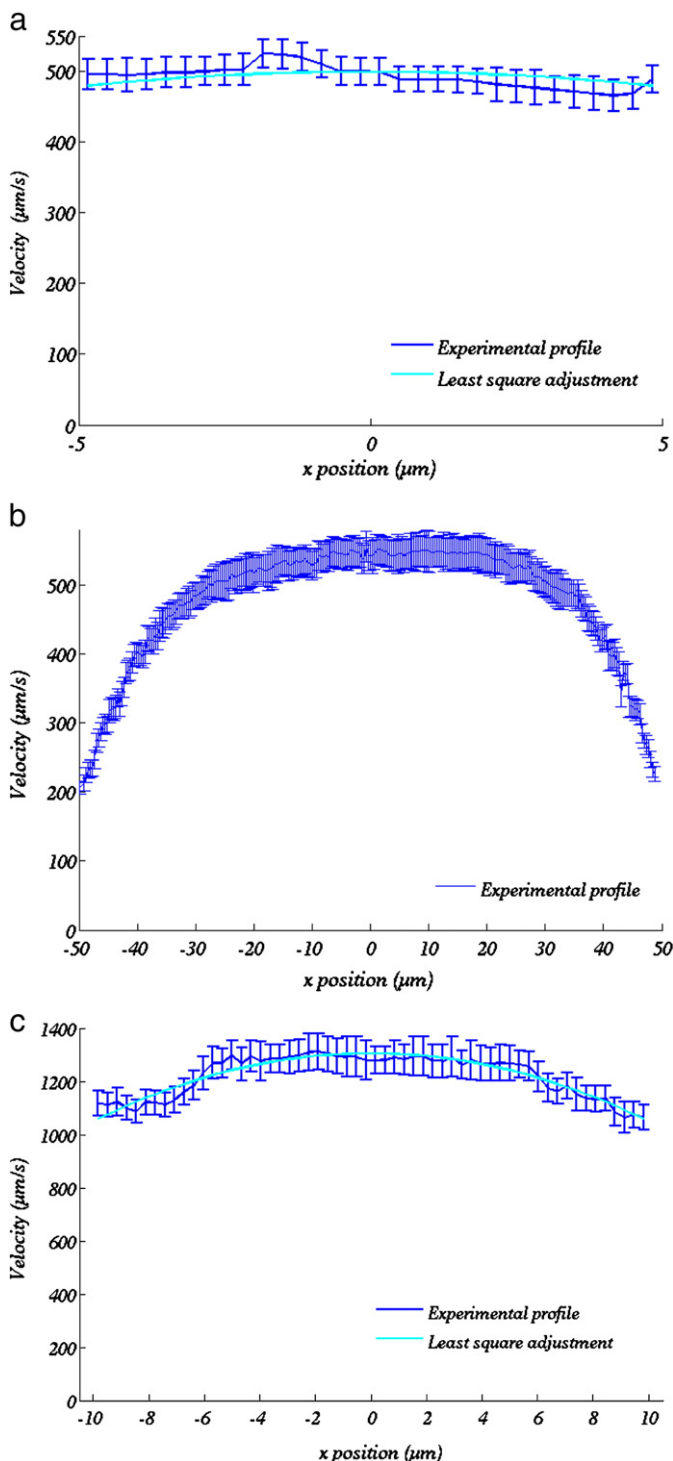


Fig. 11. Maximal velocity profiles obtained by dual-slit in the transverse direction of *in vitro* channels. In all cases, the dual-slit was implemented using $w=1$ pixel and $h=3$ pixels. The error bars represent the cumulated contributions of the intrinsic error due to the principle of the dual-slit technique (2%) and the experimental uncertainties. The latter (~3%) include the uncertainties on L_s and T_{max} (1 pixel and $1/F$, respectively) and the relative uncertainty on δ (~1%). These three contributions are of the same order. a) 10 μm × 10 μm channel, $F=3000$ fps, $M=40000$ images, $H_D=0.5$, $D=10$ μm, $\delta=3$ pixels/μm, $\Delta P=12$ mbar. The least square adjustment to Eq. (7) yields $B=0.039$ and $V_{max}=499.3$ μm/s. b) 100 μm × 20 μm channel, $F=2000$ fps, $M=20000$ images, $H_D=0.2$, $D=20$ μm, $\delta=2.79$ pixels/μm, $\Delta P=2.5$ mbar. c) 20 μm × 20 μm channel, $F=2000$ fps, $M=20000$ images, $H_D=0.4$, $D=20$ μm, $\delta=2.9$ pixels/μm, $\Delta P=13.5$ mbar. The least square adjustment to Eq. (7) yields $B=0.19$ and $V_{max}=1305.5$ μm/s.

curves). For comparison purposes, the curves obtained for synthetic image sequences corresponding to a parabolic velocity profile are displayed on the same figures (light blue curves). In both cases, the behavior of V_{ds} as a function of L_s at small to moderate separation distances is closer to the experimental behavior when the synthetic profile matches the experimental one. To quantify this, the normalized mean square differences between the measured velocities for synthetic image sequences and the corresponding images recorded *in vitro* were calculated for all L_s below 40 μm. In the case of the 10 μm × 10 μm microchannel, these differences were 0.23 for $B=1$ and 0.06 for $B=0$. Similarly, for the 20 μm × 20 μm channel, the errors were 0.35 for $B=1$ and 0.11 for $B=0.19$.

In the case of the high-aspect-ratio rectangular channel, the assumption that the (unknown) velocity profile in the (small) channel depth is close to the velocity profile in a square channel of the same size, even if quite rough, can be made. The results obtained with the corresponding bluntness parameter ($B=0.19$) are plotted in Fig. 10b (dark blue curve). Once again, the comparison with the experimental behavior is much better than when a parabolic velocity profile is assumed. The normalized mean square differences are 0.42 and 0.05 for $B=1$ and $B=0.19$, respectively.

Discussion and conclusion

Main findings of the study

As indicated in the Introduction, the objectives of the present study were twofold.

Firstly, we aimed to understand the physical signification of the cross-correlation velocity measured by the dual-slit technique in situations where the flow showed velocity gradients, the shapes of which were, *a priori*, unknown. In this framework, the main result of this paper is the following. Provided the distance between the two slits is large enough for the slowest RBCs to “decorrelate” and small enough to avoid complete loss of correlation, the cross-correlation velocity measured by the dual-slit technique corresponds to the maximal velocity in the direction parallel to the light beam. This distance is typically between 5 and 10 times the characteristic size of a single RBC. Moreover, the results obtained suggest that studying the variations of the measured velocity *versus* the slit separation distance at small to moderate separation could provide qualitative information on the shape of the velocity profile in the same direction.

Secondly, we aimed to determine a robust way of choosing the experimental parameters to allow this maximal velocity to be measured with high accuracy. These parameters are summarized in Table 2.

The present discussion is organized as follows. Firstly, the validity of the approach chosen in order to overcome the lack of knowledge about the RBC velocity profile, *i.e.* comparison of the results obtained using simplified synthetic image sequences and *in vitro* movies of flowing RBCs, will be discussed. Secondly, the impact of the choice of the slit separation distance on the results of a dual-slit measurement and the corresponding conversion factor usually used to deduce the mean velocity and flow rate will be addressed. Then, the practical robustness and the limitations of the optimized dual-slit technique will be presented. Finally, the implications of the above results in the field of microvascular research will be highlighted.

Validity of the present approach

The synthetic sequences of images used to validate and optimize the dual-slit technique are a very rough representation of blood flow. Firstly, the rendering of RBCs on real image sequences is much more complex, with shapes more complicated than ellipsoids, and with variations in gray level depending on their orientation relative to the light beam. Secondly, at large concentration, several RBCs

may overlap in the optical path, with a non-linear light attenuation (Pries et al., 1983). In addition, in this case, the estimation of the resulting hematocrit as the ratio between the area occupied by the synthetic particles and the total area of the channel is a mere approximation. Finally, the dynamical effects induced by RBCs (deformation, hydrodynamic interactions between RBCs or with the vessel wall) are ignored, even though these effects induce a faster deformation of the patterns formed by the RBCs inducing faster losses of correlation between the two slits.

Despite these strong simplifications, the results obtained by dual-slit with real image sequences of RBCs flowing in a microchannel closely match the results obtained using synthetic image sequences. In particular, the variations of the measured velocity with the slit separation distance, which contains all the useful information necessary to interpret the results of a dual-slit measurement, are identical. Moreover, our results demonstrate that these variations are independent of both hematocrit and height of the channel. In consequence, any uncertainty on their values does not impair the measurement, which, *a posteriori*, validates the use of a very rough representation of individual RBCs in our synthetic images generator.

Altogether, by going back and forth between synthetic and real *in vitro* image sequences, the above results demonstrate that the dual-slit technique can be used for measuring the maximal RBC velocity in the depth of a microchannel. This is consistent with previous theoretical work on the influence of slit separation distance (Lee and Duling, 1989), see below.

Influence of slit separation distance

To our knowledge, the influence of the slit separation distance (L_s) was first studied by Silva and Intaglietta (1974), who focused on the degree of correlation between the upstream and downstream signals. By performing intravital experiments on cat microvessels, they demonstrated that the value of the correlation peak decreased monotonically with increasing slit separation distance. In fact, the farther apart the slits were, the more the traveling RBCs changed shape and orientation, with subsequent modifications of their contribution to the light modulation between the slits. In addition, Intaglietta et al. (1975) suggested that, while choosing small separation distances maximizes the cross-correlation, too-small distances induce additional autocorrelation in the calculation. Consequently, they recommended that the spacing between the two slits should be at least one RBC size, which, given our results, is still insufficient.

Lee and Duling (1989) reexamined the influence of L_s on the measured velocity. To do so, they assumed a Poiseuille flow and that the light signal received by the first slit, a photodiode, was a sine function. In this case, using the indicator dilution theory in the frequency domain, they analytically demonstrated that the signal in the second slit was also a sinusoid, attenuated from the input and shifted in phase. They argued that the corresponding time delay was the time maximizing the cross correlation between both slits, and computed it from the previous analytical results as a function of the slit separation distance and the frequency of the input signal. However, Lee and Duling chose to non-dimensionalize the resulting velocity using the mean velocity. In other words, following previous authors, they focused on determining the empirical conversion factor, i.e. the ratio of the measured velocity (V_{ds}) to the mean velocity (V_{mean}).

Consequently, while they reached the correct conclusion that, for a large dimensionless time delay between the two slits, i.e. for asymptotically large slit separation distances and/or high frequency photometric signals, the measured velocity asymptotically approached the maximal velocity, they did not take advantage of this result for practical purposes. On the other hand, they demonstrated that, when this dimensionless time reached zero, i.e. the spacing between the slits was made infinitesimal and/or the photometric signals were composed of low frequency fluctuations, the measured velocity corresponded to the mean

velocity. In between, they demonstrated that the measured to mean velocity ratio increased monotonically. Altogether, their results suggest that, in order to perform a velocity measurement by dual-slit that is directly related to an actual velocity flow scale (i.e. mean or maximal velocity), asymptotically small or large slit separation distances must be used. In real experiments, however, the light signals are not ideal sinusoids and autocorrelation dominates for the calculation of the cross-correlation at small separations. Therefore, within this limit, the corresponding time delay equals zero, leading to an undetermined value of the measured velocity. Moreover, at small separation distances, fluctuations induced by insufficient acquisition frequencies are maximal, which renders the small separation distance limit unsuitable for practical purposes. Consequently, consistently with our approach, large slit separations must be considered in order to measure the RBCs' maximal velocity. Of course, the drawback is that the degree of correlation decreases monotonically with the slit separation distance. In other words, in practice, a high degree of correlation does not guarantee a correct and meaningful measurement. Our study indeed has shown that, in the large separation limits, the correlation is sometimes lost. This leads to sudden jumps in the variations of the measured velocity versus the slit separation distance, which can be easily detected. In this case, the statistical convergence can be improved by repeating the measurement over multiple locations along the channel (see The dual-slit technique section).³

Conversion factor and velocity profile

Because flow rate is one of the most important physiological parameters and because of the uncertainties on the actual signification of the measurement provided by the dual-slit technique, Baker and Wayland (1974) performed a detailed experimental study using control experiments with prescribed flow rate. They concluded that the flow rate, within 10% error, corresponded to the measured centerline velocity divided by a factor 1.6 and multiplied by the tube cross section, in tubes less than 90 μm in diameter. They presented an averaging model (see Eq. (1)) in an attempt to take account of the modulation of light by concentric laminae of RBCs moving at different velocities to explain the 1.6 conversion factor. With this model and assuming a parabolic velocity profile and a negligible transverse extent of the sensing region, the centerline velocity measured by dual-slit should be 1.6 times the mean velocity, in accordance with their experimental results. However, this averaging approach is not able to reproduce the strong dependence of the conversion factor on the slit separation distance, i.e. the monotonic increase from 1 to 2, theoretically predicted by Lee and Duling (1989) and confirmed in the present work in both synthetic and real experiments. This demonstrates that the Baker and Wayland averaging approach is incorrect, the factor 1.6 being obtained by chance in the admissible range. Nevertheless, this conversion factor is still used to relate the mean flow velocity and the velocity measured by dual-slit for investigations of blood microcirculation, see, e.g., Ong et al. (2012).

Moreover, the Baker and Wayland assumption of a Poiseuille velocity distribution for the RBCs is invalidated by the present results, which demonstrate the relevance of Eq. (7) (Pittman and Ellsworth, 1986) for describing the blunt velocity profile of RBCs measured at midplane in square channels. Compared to previous works (Baker and Wayland, 1974; Gaehtgens et al., 1970b; Lima et al., 2008; Sherwood et al., 2012), the present analysis provides much higher spatial resolution for the velocity measurement, especially near the

³ Note that, the degree of correlation decreased faster in our experiments *in vitro* than when studying synthetic image sequences. This is consistent with a faster deformation of the RBC patterns induced by their deformation and by hydrodynamic interactions. Counteracting these effects, RBC aggregation is likely to improve the patterns stability over time. Moreover, the non-uniform distribution of aggregate size is likely to increase the variety of patterns which should improve the quality of the correlation.

walls. Thus, for the first time, it is possible to measure the maximal sliding velocity of the RBCs at the channel walls, with great accuracy, in various flow configurations and to deduce the bluntness parameter without any further assumption regarding the boundary conditions.

Nevertheless, despite these improvements, information on both the hematocrit distribution and the velocity of plasma relative to RBCs, especially near the channel wall, is still lacking for the evaluation of the flow rate.

Robustness and limitations of the DS technique

When the dual-slit technique needs to be applied, the optimal conditions for measuring the maximal velocity cannot always be satisfied. In particular, the choice of photosensor size and/or spacing may be limited by the kind of photosensors that are used: phototransistors (Baker and Wayland, 1974; Gaehtgens et al., 1970a), photodiodes (Pries et al., 1989; Sapuppo et al., 2007; Silva and Intaglietta, 1974), optical fibers (Lee and Duling, 1989), or areas of interest in digitized image sequences (Intaglietta et al., 1975; Liu et al., 2009). Whatever the photosensors used, the present results demonstrate that their width (transverse extent) should be small compared to the size of an RBC, as also suggested by Intaglietta et al. (1975). This is easily achieved when using digitized image sequences of RBCs, as in the present work, and leads to a very good spatial resolution, typically 0.3 μm in the present study. In contrast, the use of photosensors that are large compared to the channel width averages the light modulations over large regions and greatly reduces the sensitivity of the dual-slit method, thus producing significant distortions in the measured velocity profiles, especially in regions of large transverse velocity gradients, typically near the walls (Baker and Wayland, 1974).

Moreover, when using video image sequences, the separation between the two slits can be varied, which provides valuable information on the validity of the measurement (see below), and allows the measurements to be repeated over multiple slit locations to improve statistical convergence.

In this case, the dual-slit appears to be a precise (less than 5% error, see Fig. 11 and legend), robust method for measuring the maximal velocity in the direction parallel to the light beam, especially for *in vitro* applications. Our results demonstrate that the measurements are independent of the shape of the velocity profile, the hematocrit and, provided that the depth of field of the optical set-up is sufficient, the depth of the channel.

Several limitations must, however, be highlighted as far as *in vivo* RBC flows are concerned. First, the vessel must be sufficiently straight and long for the distance between the two slits to be satisfactory for the application of the technique. Second, it is not possible to measure unsteady flows because of the need for time averaging to ensure statistical convergence. In contrast, the shape of the channel cross-section certainly has no effect on the dual-slit results. Moreover, the shape of

RBCs flowing in PDMS microchannels and in the actual *in vivo* microcirculation is very similar (Shevkoplyas et al., 2003). This suggests that the optimized dual-slit technique can also be useful for measuring time-averaged velocities *in vivo*.

Implications in microvascular research

Many pathophysiological studies have measured the velocity of RBCs using the dual-slit technique. Most of the time, they were based on previous metrological works, which are summarized in Table 3. However, even in these works with a metrological focus, the parameters used for the implementation of the dual-slit technique have never been optimized. As a result, none of these studies fulfilled all the criteria defined in Table 2. In particular, L_s did not exceed the size of one RBC for most of these studies, which implies that the asymptotic value of V_{max} was not reached. Also, the frame rate and acquisition time proved to be small with respect to the measured velocity range.

While the order of magnitude of the errors in these previous works is difficult to quantify, mainly because some of the relevant quantitative information is missing, the data collected in Table 3 suggest that the errors on the measured velocities were not negligible. In fact, in the present work, large fluctuations of the measured velocity were observed when the parameters used were far from the optimal conditions (e.g. in Fig. 4). This may explain why significant inaccuracies in the interpretation of *in vivo* photometric measurements, up to a factor 10 for blood flow rate measurements, have already been identified by Cokelet et al. (1998), who aimed to quantify the measurement errors by evaluating the deviation from mass conservation.

To conclude and sum up, a detailed analysis of the dual-slit technique has been performed using synthetic image sequences representing the flow of RBCs in a plane parallel to the light beam direction, i.e. images which are inaccessible to the observer in experiments *in vitro* or *in vivo*. This parametric study has identified the optimal conditions for using the dual-slit technique and determined the operational criteria that must be fulfilled to satisfy them. In this case, the measured velocity has been shown to be the maximal velocity in the direction parallel to the light beam, whatever the flow rate, hematocrit and channel depth. This optimized dual-slit technique was then validated using *in vitro* image sequences, permitting the profile of maximal RBC velocity across the channel to be measured. These profiles are blunter than a parabolic profile, and have a non-zero sliding velocity at the channel walls.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge D. Bourrier, M. Dilhan and P. Joseph from LAAS-CNRS, Toulouse for their help in the microfabrication and microfluidic experiments, and Sébastien Cazin from IMFT for his help in image acquisition and post-processing. We also thank Susan

Table 3
Parameters used in previous studies for dual-slit implementation.

Authors	L_s (RBC size)	F (Hz or fps)	T_{acq} (s)	w (μm)	h (μm)	V_{ds} range (mm/s)	Conversion factor ($V_{\text{ds}}/V_{\text{mean}}$)
a) <i>In vivo</i> studies							
Gaehtgens et al. (1970a)	n/a	120	12.5×10^{-3} –0.125	n/a	n/a	~1.7–30	n/a
Silva and Intaglietta (1974)	0.5–9	n/a	~20	2.5–5	n/a	~3	n/a
Intaglietta et al. (1975)	~1	≤ 30	n/a	<8	n/a	0.6–3	n/a
Pries et al. (1989)	<1	n/a	n/a	~8	~8	n/a	1.64–1.8
Lee and Duling (1989)	<1	6200	0.2	2.5	4.7	~1	~1.58
Liu et al. (2009)	~1	2000	10	1 pixel	= vessel diameter	0.7–2.6	n/a
b) <i>In vitro</i> studies							
Baker (1972)	~1	≤ 500	n/a	2–5	2–5	1–50	1.6
Lipowsky et al. (1980)	~1	n/a	n/a	~8	~8	n/a	n/a
Sapuppo et al. (2007)	~2	5000	≤ 12	6.4	21	0–25	n/a

Becker who helped to improve the English of this manuscript. Sophie Roman is the recipient of a doctoral fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work has been partially financed by GDR CNRS 2760 “Biomécanique des fluides et des transferts: Interactions Fluide Structure Biologique”, BQR INPT 2011 (VLAN Project) and by the Fermat Research Federation (FR INPT-UT3-CNRS-INSA Toulouse 3089).

References

- Baker, M., 1972. Double-slit photometric measurement of velocity profiles for blood in microvessels and capillary tubes. Ph.D. thesis, California Institute of Technology.
- Baker, M., Wayland, H., 1974. On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc. Res.* 7, 131–143.
- Cokelet, G., Pries, A., Kiani, M., 1998. Observations on the accuracy of photometric techniques used to measure some *in vivo* microvascular blood flow parameters. *Microcirculation* 5, 61–70.
- Eddings, M.A., Johnson, M.A., Gale, B.K., 2008. Determining the optimal pdms-pdms bonding technique for microfluidic devices. *J. Micromech. Microeng.* 18.
- Gaehtgens, P., Meiselman, H., Wayland, H., 1969. Evaluation of the photometric double slit velocity measuring method in tubes 25 to 130 bore. *Bibl. Anat.* 10, 571–578.
- Gaehtgens, P., Meiselman, H.J., Wayland, H., 1970a. Erythrocyte flow velocities in mesenteric microvessels of the cat. *Microvasc. Res.* 2, 151–162.
- Gaehtgens, P., Meiselman, H.J., Wayland, H., 1970b. Velocity profiles of human blood at normal and reduced hematocrit in glass tubes up to 130 μ m diameter. *Microvasc. Res.* 2, 13–23.
- Huang, H., Dabiri, D., Gharib, M., 1997. On errors of digital particle image velocimetry. *Meas. Sci. Technol.* 8, 1427–1440.
- Intaglietta, M., Silverman, N., Tompkins, W., 1975. Capillary flow velocity-measurements *in vivo* and *in situ* by television methods. *Microvasc. Res.* 10, 165–179.
- Lee, J.-S., Duling, B.R., 1989. Role of flow dispersion in the computation of microvascular flows by the dual-slit method. *Microvasc. Res.* 37, 280–288.
- Lee, T.Q., Schmid-Schönbein, G.W., Zweifach, B.W., 1983. The application of an improved dual-slit photometric analyzer for volumetric flow rate measurements in microvessels. *Microvasc. Res.* 26, 351–361.
- Lima, R., Wada, S., Tsubota, K.I., Yamaguchi, T., 2006. Confocal micro-piv measurements of three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel. *Meas. Sci. Technol.* 17, 797–808.
- Lima, R., Wada, S., Tanaka, S., Takeda, M., Ishikawa, T., Tsubota, K.I., Imai, Y., Yamaguchi, T., 2008. *In vitro* blood flow in a rectangular PDMS microchannel: experimental observations using a confocal micro-PIV system. *Biomed. Microdevices* 10, 153–167.
- Lipowsky, H., Usami, S., Chien, S., Pittman, R.R., 1980. Hematocrit determination in small bore tubes from optical-density measurements under white-light illumination. *Microvasc. Res.* 20, 51–70.
- Liu, Y., Yang, J., Sun, K., Wang, C., Han, J., Liao, F., 2009. Determination of erythrocyte flow velocity by dynamic grey scale measurement using off-line image analysis. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 43, 263–265.
- Long, D.S., Smith, M.L., Pries, A.R., Ley, K., Damiano, E.R., 2004. Microviscometry reveals reduced blood viscosity and altered shear rate and shear stress profiles in microvessels after hemodilution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10060–10065.
- McDonald, J., Whitesides, G., 2002. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc. Chem. Res.* 35, 491–499.
- McDonald, J., Duffy, D., Anderson, J., Chiu, D., Wu, H., Schueller, O., Whitesides, G., 2000. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* 21, 27–40.
- Ong, P.K., Namgung, B., Johnson, P.C., Kim, S., 2010. Effect of erythrocyte aggregation and flow rate on cell-free layer formation in arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, 1870–1878.
- Ong, P.K., Jain, S., Kim, S., 2012. Spatio-temporal variations in cell-free layer formation near bifurcations of small arterioles. *Microvasc. Res.* 83, 118–125.
- Parthasarathi, A., Japee, S., Pittman, R., 1999. Determination of red blood cell velocity by video shuttering and image analysis. *Ann. Biomed. Eng.* 27, 313–325.
- Pittman, R., Ellsworth, M., 1986. Estimation of red-cell flow in microvessels – consequences of the Baker–Wayland spatial averaging model. *Microvasc. Res.* 32, 371–388.
- Popel, A., Johnson, P., 2005. Microcirculation and hemorheology. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 37, 43–69.
- Pries, A., Kanzow, G., Gaehtgens, P., 1983. Microphotometric determination of hematocrit in small vessels. *Am. J. Physiol.* 245, 167–177.
- Pries, A.R., Ley, K., Claassen, M., Gaehtgens, P., 1989. Red cell distribution at microvascular bifurcations. *Microvasc. Res.* 38, 81–101.
- Pries, A., Secomb, T., Gaehtgens, P., Gross, J., 1990. Blood-flow in microvascular networks – experiments and simulation. *Circ. Res.* 67, 826–834.
- Raffel, M., Willert, C.E., Wereley, S.T., Kompenhans, J., 2007. *Particle Image Velocimetry. A Practical Guide*. Springer.
- Sakai, H., Sato, A., Okuda, N., Takeoka, S., Maeda, N., Tsuchida, E., 2009. Peculiar flow patterns of RBCs suspended in viscous fluids and perfused through a narrow tube (25 μ m). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, 583–589.
- Salazar Vazquez, B.Y., Hightower, C.M., Sapuppo, F., Tartakovsky, D.M., Intaglietta, M., 2010. Functional optical imaging at the microscopic level. *J. Biomed. Opt.* 15.
- Sapuppo, F., Bucolo, M., Intaglietta, M., Johnson, P.C., Fortuna, L., Arena, P., 2007. An improved instrument for real-time measurement of blood flow velocity in microvessels. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* 56, 2663–2671.
- Sherwood, J.M., Disting, J., Kaliviotis, E., Balabani, S., 2012. The effect of red blood cell aggregation on velocity and cell-depleted layer characteristics of blood in a bifurcating microchannel. *Biomicrofluidics* 6, 024119.
- Shevkoplyas, S., Gifford, S., Yoshida, T., Bitensky, M., 2003. Prototype of an *in vitro* model of the microcirculation. *Microvasc. Res.* 65, 132–136.
- Silva, J., Intaglietta, M., 1974. The correlation of photometric signals derived from *in vivo* red blood cell flow in microvessels. *Microvasc. Res.* 7, 156–169.
- Sourice, A., Plantier, G., Saumet, J., 2005. Red blood cell velocity estimation in microvessels using the spatiotemporal autocorrelation. *Meas. Sci. Technol.* 16, 2229–2239.
- Sugii, Y., Okuda, R., Okamoto, K., Madarame, H., 2005. Velocity measurement of both red blood cells and plasma of *in vitro* blood flow using high-speed micro piv technique. *Meas. Sci. Technol.* 16, 1126–1130.
- Villela, N.R., Cabrales, P., Tsai, A.G., Intaglietta, M., 2009. Microcirculatory effects of changing blood hemoglobin oxygen affinity during hemorrhagic shock resuscitation in an experimental model. *Shock* 31, 645–652.
- Wayland, H., 1973. Photosensor methods of flow measurement in the microcirculation. *Microvasc. Res.* 5, 336–350.
- Wayland, H., Johnson, P.C., 1967. Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric method. *J. Appl. Physiol.* 22, 333–337.

Pour résumer ce travail, l'investigation de la technique de *dual-slit* à partir d'images de synthèse d'écoulements de globules rouges nous a permis de déterminer les conditions optimales d'application de la technique en termes de fréquence d'acquisition, de temps d'acquisition, de distance entre les *slits*, et de taille des *slits*. Dans ces conditions, la vitesse mesurée correspond, dans tous les cas, à la vitesse maximale de l'écoulement. Appliquée ensuite à une séquence d'images d'écoulement *in vitro* pour différentes positions dans la largeur du canal, la *dual-slit* permet d'aboutir à un profil de vitesse maximale des globules rouges dans la profondeur du canal.

Profils de vitesse des globules rouges

Ainsi, le travail que nous venons de présenter fournit des informations sur la forme du profil de vitesse des globules rouges dans les micro-canaux de section carrée. En effet, la méthode de *dual-slit* permet de mesurer $V_{max}(x)$, qui représente le profil de vitesse des globules rouges dans le plan médian du micro-canal, soit $V_{max}(x) = V(x, y = 0)$, où $V(x, y)$ est la vitesse des globules rouges en un point de la section du canal. Ce profil de vitesse peut être décrit grâce à l'équation suivante :

$$V_{max}(x) = V_0 \left(1 - B \left(\frac{x^2}{(W/2)^2} \right) \right), \quad (3.1.1)$$

où W est la largeur du canal, V_0 est la vitesse au centre du canal ($V_0 = V(0, 0)$), et B est le paramètre d'aplatissement du profil de vitesse, tel que $0 \leq B \leq 1$. Lorsque $B = 1$, le profil de vitesse maximale est parabolique et lorsque $B = 0$ le profil est plat. Avec cette description $V_0(1 - B)$ représente la vitesse de glissement des globules aux niveaux des parois du canal. Cette forme de profils de vitesse, qui décrit bien nos résultats expérimentaux (cf. section 4.2), a été initialement décrite *in vivo* par Pittman and Ellsworth (1986). De tels profils de vitesse sont représentés en figure 3.3.1 pour différentes valeurs de B .

L'autre paramètre important, après la vitesse, pour décrire l'écoulement des globules rouges est l'hématocrite de tube. Nous présentons maintenant les différentes méthodes permettant de l'évaluer.

3.2 Mesure de l'hématocrite de tube

Au cours d'une expérience d'écoulement de globules rouges dans des micro-canaux, la fraction volumique de globules rouges contenue dans le réservoir d'alimentation est connue, mais celle-ci est différente de la fraction volumique de globules rouges dans les micro-canaux (hématocrite de tube, H_t). Cette différence est essentiellement due à l'apparition d'une couche de faible hématocrite aux parois des canaux, et à l'effet Fåhræus (cf. Section 1.1.4). Nous avons donc développé des méthodes pour mesurer

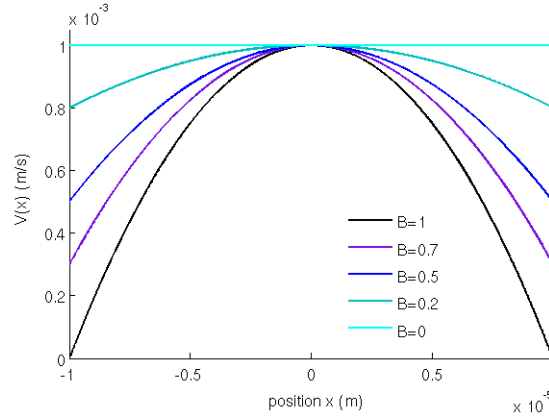


FIGURE 3.1.1: Description des profil de vitesse maximale dans les micro-canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$, selon l'équation 3.1, en considérant $y = 0$, $V_0 = 1\text{ mm/s}$ et 5 valeurs différentes de B .

l'hématocrite de tube à partir des séquences d'images de l'écoulement acquises lors de nos expériences *in vitro*. Selon la concentration en globules rouges et la taille du micro-canal, une ou plusieurs des méthodes décrites ci-dessous peuvent être appliquées.

3.2.1 Mesure de l'hématocrite par comptage

Lorsque l'hématocrite de tube est peu élevé, nous pouvons aisément compter le nombre de globules rouges présents dans un volume connu du canal. Étant donné que le volume d'un globule rouge humain est en moyenne de $\mathcal{V}_{GR} = 92\text{ }\mu\text{m}^3$ (Chen et al., 2011), le rapport entre le volume de globules rouges et le volume de la portion de canal considérée peut être évalué. Le comptage des globules rouges est réalisé manuellement et moyenné en prenant en compte vingt images de l'écoulement, assez espacées temporellement les unes des autres afin de ne pas compter deux fois les mêmes cellules. Dans un canal de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$, il est possible de déterminer l'hématocrite par comptage jusqu'à $H_t \approx 8\%$, tandis que dans un canal de section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ les globules rouges peuvent être individualisés et donc comptés jusqu'à $H_t \approx 13\%$.

Dans les conditions expérimentales étudiées, les globules rouges circulent à la file indienne, la plupart du temps, dans les canaux de section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$, et H_t n'y dépasse généralement pas 13%. H_t peut donc y être déterminé par comptage. En revanche, dans les canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$, il est fréquent que l'hématocrite soit supérieur à 8%. Il devient alors impossible de distinguer les globules rouges les uns des autres, et donc de les compter. Une technique photométrique a donc été développée pour déterminer l'hématocrite dans ce cas. Elle est présentée dans ce qui suit.

3.2.2 Mesure de l'hématocrite par une méthode photométrique

Une méthode photométrique de détermination de l'hématocrite, a été développée pour les canaux de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ lorsque l'hématocrite est élevé et qu'il est impossible d'individualiser les globules rouges. En s'inspirant de la méthode de Pries et al. (1983), décrite précédemment (cf. section 1.3.2.3), notre but a été de relier une mesure de la densité optique (DO) dans le canal à l'hématocrite de tube (H_t). Pour cela, l'intensité du faisceau de lumière incidente est évaluée à partir de l'image du canal contenant seulement le liquide suspendant, avant l'injection des globules rouges. L'intensité du faisceau de lumière transmise est déterminée à partir de la séquence d'images de l'écoulement des globules rouges, précédemment utilisée pour les mesures de *dual-slit*. La figure 3.2.1 résume la méthode de calcul de la DO , dont les quatre étapes sont détaillées ci-dessous.

Pour caractériser le faisceau de lumière transmise, sur les 20000 images que comporte la séquence d'écoulement de globules rouges, 1000 images sont considérées, en prenant une image sur 20 de sorte à ne pas prendre en compte deux fois les mêmes globules. Toutes les images, comprenant celle du canal sans globules rouges, sont d'abord normalisées afin de s'affranchir des changements d'intensité lumineuse qui peuvent se produire entre le moment où la première image est enregistrée et le moment où la séquence d'images avec les globules rouges est filmée. L'intensité de niveau de gris choisie pour normaliser les images correspond à la moyenne (spatiale et temporelle) du niveau de gris d'une zone, aussi grande que possible, de l'image ou de la séquence d'images, prise en-dehors du canal et assez loin des bords, pour s'affranchir des fluctuations d'intensité lumineuse dues au passage des globules rouges. Cette étape est représentée sur la figure 3.2.1 A, où $I_0(x, z)$ représente le faisceau de lumière incidente normalisée et $G(x, z, n)$ le faisceau de lumière transmise normalisée.

La deuxième étape (figure 3.2.1 B) consiste à calculer la moyenne, sur la durée de la séquence, du niveau de gris en chaque pixel du canal contenant les globules rouges :

$$I(x, z) = \frac{1}{1000} \sum_{n=0}^{999} G(x, z, n \times 20 + 1) \quad (3.2.1)$$

L'atténuation de la lumière en tout point de coordonnées (x, z) dans le canal en est déduite :

$$A(x, z) = \frac{I_0(x, z)}{I(x, z)}. \quad (3.2.2)$$

Le profil des valeurs de DO est calculé en effectuant la moyenne de I_0/I ligne par ligne dans le canal (figure 3.2.1 C, courbe) et en prenant le logarithme (figure 3.2.1 D), soit :

$$DO(x) = \log \left(\frac{1}{L} \sum_{z=1}^L A(x, z) \right), \quad (3.2.3)$$

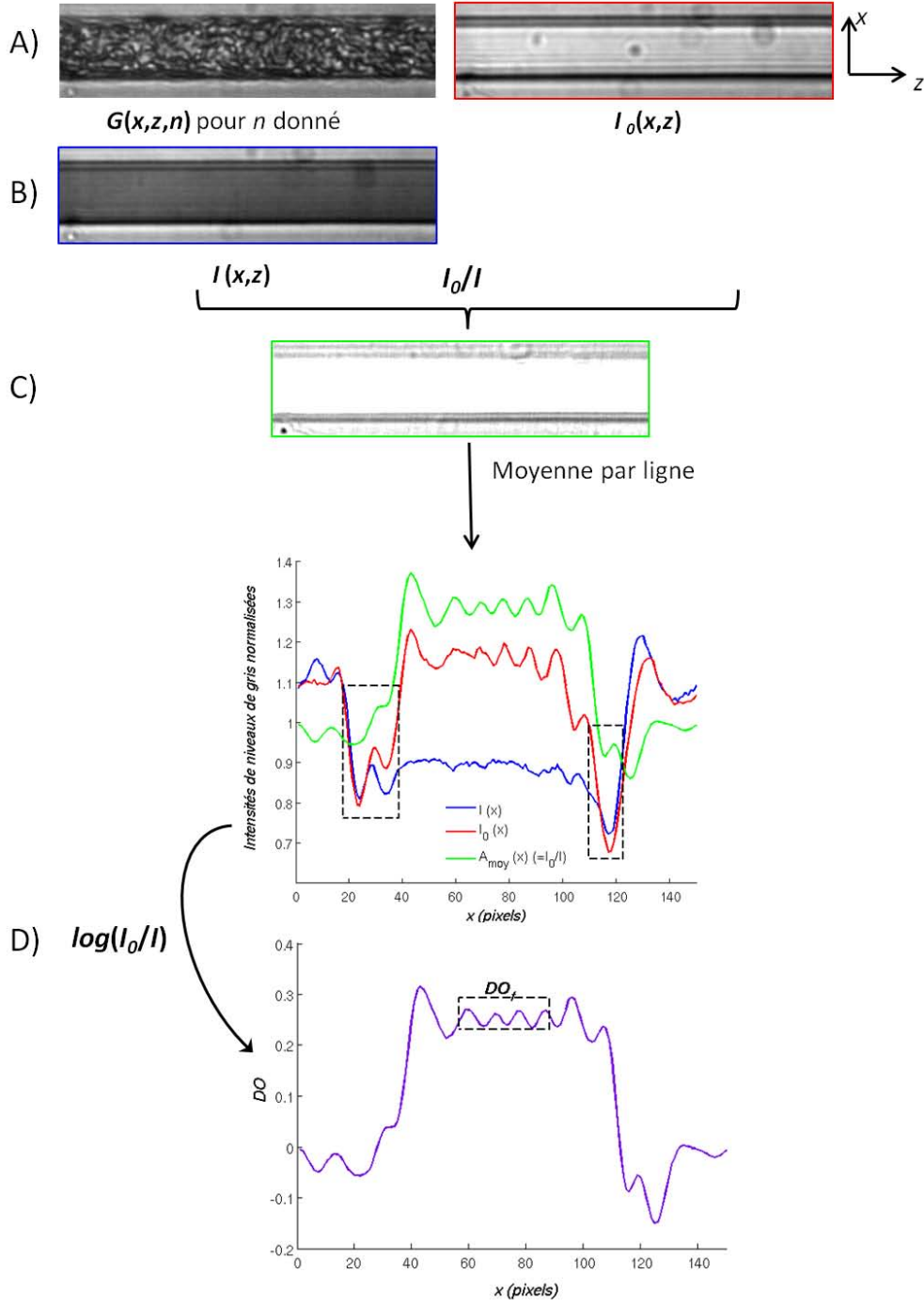


FIGURE 3.2.1: **Méthode de calcul de la densité optique** pour une séquence d'image donnée. A) La séquence d'images représentant la lumière transmise et l'image représentant la lumière incidente sont normalisées. B) $G(x, z, n)$ est moyennée sur la durée de la séquence. C) L'atténuation de la lumière par les globules rouges dans le canal est calculée. Les zones encadrées en pointillées correspondent aux bords du canal. D) La densité optique est donnée par le logarithme de l'atténuation moyenne pour chaque ligne du canal. La zone encadrée correspond aux valeurs prises en compte pour mesurer DO_f .

où L est la longueur du canal sur les images (en pixels).

La courbe verte de la figure 3.2.1 C montre le profil d'atténuation moyenne, $\sum_{z=1}^L A(x, z)$. Par ailleurs, à titre d'exemple, la figure 3.2.1 C présente les profils d'intensité moyenne de lumière transmise et incidente. Les oscillations observées sur ces courbes correspondent à des fluctuations de l'intensité lumineuse à l'intérieur du canal, surtout visibles sur l'image du canal sans les globules rouges. Ces fluctuations sont vraisemblablement dues à un phénomène de diffraction de la lumière dans le microsysteme.

Pour finir (figure 3.2.1 D), nous retenons une valeur unique de la densité optique, DO_f , qui est la moyenne de $DO(x)$ pour des valeurs de x correspondant au centre du canal plus ou moins 15 pixels, de sorte à ne pas prendre en compte les effets de bords.

C'est cette valeur finale que nous souhaitons relier à l'hématocrite déterminé par comptage, dans l'objectif d'évaluer H_t par la seule connaissance de DO_f .

La figure 3.2.2 présente les variations de DO_f avec H_t mesuré par comptage. Cette variation est quasi-linéaire, avec une ordonnée à l'origine égale à 0, qui correspond au cas $I_0 = I$. Pour les gammes d'hématocrites de tube dans lesquelles nous nous trouvons ($\leq 10\%$) l'atténuation de la lumière est essentiellement due à sa diffusion à travers les globules rouges et varie linéairement avec H_t (cf. Section 1.3.2.3, figure 1.3.5).

Par une régression linéaire, nous obtenons la relation : $H_t = 101,01 \times DO_f$.

3.2.3 Comparaison des mesures d'hématocrite par la méthode photométrique et par comptage

Sur la figure 3.2.3 nous traçons l'hématocrite déterminé à partir de la densité optique en fonction de l'hématocrite mesuré par comptage. Nous générons, grâce à une méthode statistique (fonction MATLAB *polyconf*), l'intervalle de confiance à 95%, c'est-à-dire un intervalle qui a 95% de chances de contenir la vraie valeur de l'hématocrite, lors d'une mesure de l'hématocrite par la méthode photométrique. Ainsi, nous déterminons que l'incertitude absolue sur la mesure de l'hématocrite par la méthode photométrique est égale à $\pm 0,02$. Dans toute la suite, en s'appuyant sur les données de Lipowsky et al. (1980) (cf. Section 1.3.2.3, figure 1.3.5), nous faisons l'hypothèse que DO_f continue à varier linéairement avec H_t jusqu'à $H_t \approx 18\%$.

Dans les cas d'écoulement de globules rouges dans des micro-canaux de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ où l'hématocrite de tube n'a pas pu être évalué par comptage, l'hématocrite mesuré, par la méthode photométrique varie de 8,4% à 16%, c'est-à-dire dans la gamme où H_t varie linéairement avec la DO . La validité de ces mesures d'hématocrite sera confirmée par la suite, en appliquant le principe de conservation de la masse aux débits de globules rouges, calculé en faisant intervenir H_t , au niveau des trois branches d'une bifurcation (section 4.1).

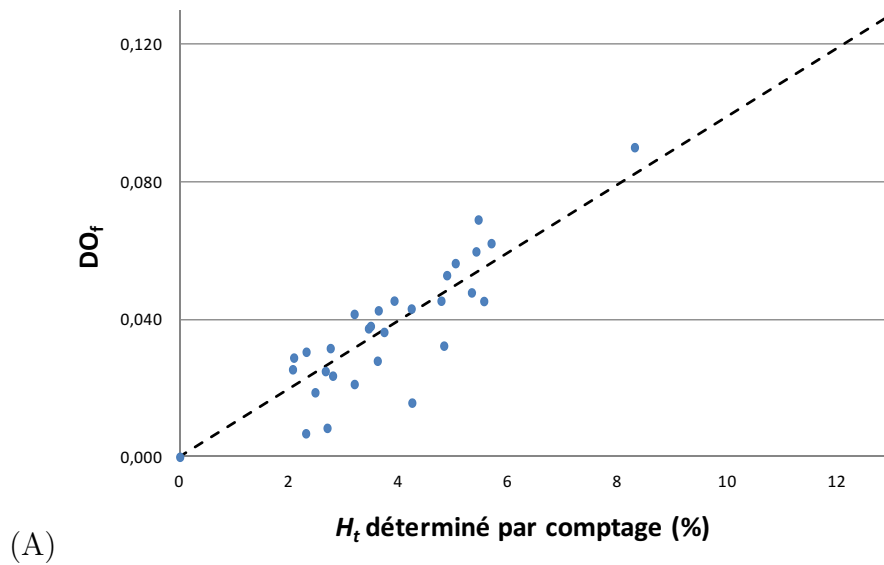


FIGURE 3.2.2: **Mesure de l'hématocrite de tube à partir de la densité optique.** Variation de la densité optique (DO_f) avec l'hématocrite déterminé par comptage, mesurée sur les canaux de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ (points bleus). Nous avons déterminé $DO_f = 0,0099 \times H_t$ (courbe pointillée).

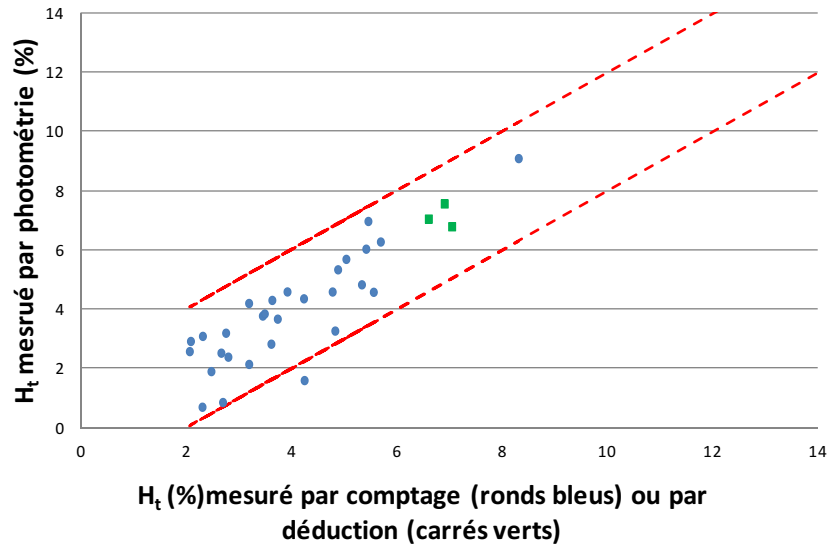


FIGURE 3.2.3: **Hématocrite déterminé à partir de la densité optique en fonction de l'hématocrite obtenu par comptage** (points bleus), et intervalle de confiance des estimations de l'hématocrite (droites pointillées rouges) par la méthode photométrique, H_t est mesuré à $\pm 2\%$ près. Les carrés verts correspondent à l'hématocrite déterminé par la méthode de déduction (en abscisse).

3.2.4 Estimation de l'hématocrite par déduction

Dans certains cas, il est possible de déterminer l'hématocrite par comptage dans deux branches d'une bifurcation, mais pas dans la troisième. Ceci arrive généralement quand la micro-bifurcation est de type $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-10\mu\text{m}$, où les globules rouges circulent en file indienne dans les branches filles, et où, par contre, dans la branche mère, de plus grande section, il est impossible d'individualiser les globules rouges et donc de les compter (voir figure 3.2.4). Dans ce cas, nous pouvons déterminer l'hématocrite dans la branche d'entrée, H_t^e , grâce à l'application du principe de conservation de la masse des globules rouges. En effet :

$$Q_{GR}^e = Q_{GR}^1 + Q_{GR}^2. \quad (3.2.4)$$

Ici, les exposants e , 1 et 2 font respectivement référence à la branche d'entrée et aux deux branches filles. Le débit dans la branches fille i est calculé en multipliant l'hématocrite de tube déterminé par comptage par la section du canal (S^i), et par la vitesse moyenne des globules rouges (\bar{V}_{GR}^i) évaluée grâce aux mesures de *dual-slit* (ce calcul est explicité dans la section 3.3.1.2), soit : $Q_{GR}^i = H_t^i \times S^i \times \bar{V}_{GR}^i$. De même, la vitesse moyenne dans la branche d'entrée peut être évaluée à partir des mesures de *dual-slit*, nous connaissons alors $S^e \times \bar{V}_{GR}^e$. Nous obtenons alors l'hématocrite dans la branche d'entrée grâce à la relation suivante :

$$H_t^e = \frac{Q_{GR}^1 + Q_{GR}^2}{S^e \times \bar{V}_{GR}^e}. \quad (3.2.5)$$

Les résultats obtenus par la méthode photométrique en fonction de ceux obtenus par cette méthode de déduction sont reportés figure 3.2.3, montrant que ces données se situent bien dans l'intervalle de mesure de la méthode photométrique.

3.3 Mesures de débits volumiques

Pour étudier l'effet de séparation de phase au niveau de micro-bifurcations, nous souhaitons connaître les débits de globules rouges et les débits de fluide suspendant dans chacune des trois branches. Les débits de globules rouges peuvent être obtenus par comptage, ou à partir de la mesure d'hématocrite et du profil de vitesse maximale obtenu par *dual-slit*, en faisant une hypothèse sur la forme du profil de vitesse dans la section droite du canal (section 3.3.1.1 et section 3.3.1.2). Le débit de fluide suspendant est déterminé en faisant des hypothèses fortes sur son profil de vitesse (section 3.3.2). Les méthodes présentées ci-dessous sont données pour des canaux de section carrée.

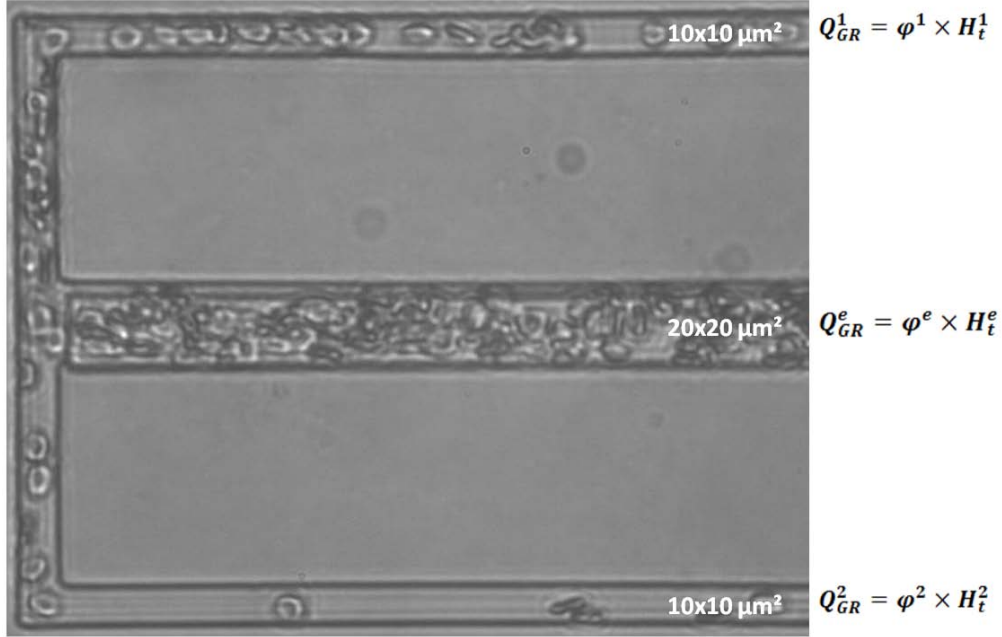


FIGURE 3.2.4: **Globules rouges dans une micro-bifurcations** 10μm-20μm-10μm, H_t^1 et H_t^2 sont déterminés par comptage des globules rouges, H_t^e est déterminé par déduction en connaissant Q_{GR}^1 , Q_{GR}^2 et $\varphi^e = S^e \times V_{GR}^e$.

3.3.1 Débit de globules rouges

3.3.1.1 Estimation du débit par comptage

Dans certains cas les globules sont assez peu nombreux pour pouvoir être individualisés et donc comptés. Nous déterminons alors visuellement le nombre de globules rouges (N) qui passent à travers une section du canal pendant une durée Δt . En connaissant \mathcal{V}_{GR} , le volume d'un globule rouge humain, le débit de globules est donné par :

$$Q_{compt_{GR}} = \frac{N \times \mathcal{V}_{GR}}{\Delta t}. \quad (3.3.1)$$

Cette méthode de référence, qui ne nécessite aucune hypothèse sur le profil de vitesse des globules rouges, est notamment utilisée pour comparer les débits de globules rouges obtenus par comptage et ceux obtenus grâce au profil de vitesse et à l'hématocrite (méthode suivante).

3.3.1.2 Estimation du débit à partir du profil de vitesse maximale et de l'hématocrite

Le profil de vitesse maximale des globules rouges obtenu par *dual-slit*, $V_{max}(x)$ est ajusté à l'équation 3.1 afin de déterminer V_0 et B (cf. section 3.1). Nos micro-canaux ont

une section carrée, nous considérons donc que le profil de vitesse est symétrique, c'est-à-dire que : $V_{max}(x) = V_{max}(y)$, que nous pouvons également écrire : $V(x, 0) = V(0, y)$. En faisant l'hypothèse que la forme du profil de vitesse est semblable dans tous les plans de coupes parallèles à l'un des côtés du canal ($x = cte$ ou $y = cte$) nous écrivons :

$$V(x, y) = \frac{1}{V_0} \times V_{max}(x) \times V_{max}(y) = V_0 \times \left(1 - B \left(\frac{x}{W/2}\right)^2\right) \times \left(1 - B \left(\frac{y}{W/2}\right)^2\right), \quad (3.3.2)$$

Plusieurs de ces profils de vitesses 3D hypothétiques sont tracés sur la figure 3.3.1, pour différentes valeurs de B .

Le profil de vitesse ainsi décrit est intégré sur la section du canal, pour donner :

$$\varphi = \int_{-\frac{W}{2}}^{\frac{W}{2}} \int_{-\frac{W}{2}}^{\frac{W}{2}} V(x, y) dx dy = V_0 \times W^2 \times \left(1 - \frac{1}{3}B\right)^2, \quad (3.3.3)$$

où φ représente le produit de la section du canal et de la vitesse moyenne des globules rouges.

Cette intégrale φ , multipliée par l'hématocrite de tube H_t , nous donne le débit de globules rouges :

$$Q_{GR} = \varphi \times H_t. \quad (3.3.4)$$

Notons que pour mesurer les débits de globules rouges à partir du profil de vitesse et de l'hématocrite, il serait plus juste d'intégrer le profil d'hématocrite dans le canal, plutôt que d'utiliser une valeur unique de l'hématocrite de tube. En effet, la répartition des globules rouges n'est pas forcément homogène dans un micro-canal. Cependant, nos mesures ne nous donnent pas d'information sur la répartition de l'hématocrite dans le canal. Même si cela ne semble pas compromettre la mesure de débit de globules rouges (cf section 4.1.1), il serait intéressant de connaître ce profil d'hématocrite et d'évaluer un éventuel gain sur la précision des mesures.

3.3.1.3 Comparaison des méthodes de mesure du débit de globules rouges

Lorsque la suspension de globules rouges est suffisamment diluée, cette mesure indirecte du débit de globules rouges peut être comparée à la méthode de référence (mesure par comptage). Pour tous les points expérimentaux présentés en figure 3.3.2 l'hématocrite de tube a été déterminé par comptage. Les résultats, présentés montrent un accord satisfaisant entre les deux méthodes de mesure. L'erreur relative est évaluée :

$$E = \frac{|Q_{GR}(\text{comptage}) - Q_{GR}|}{Q_{GR}(\text{comptage})}, \quad (3.3.5)$$

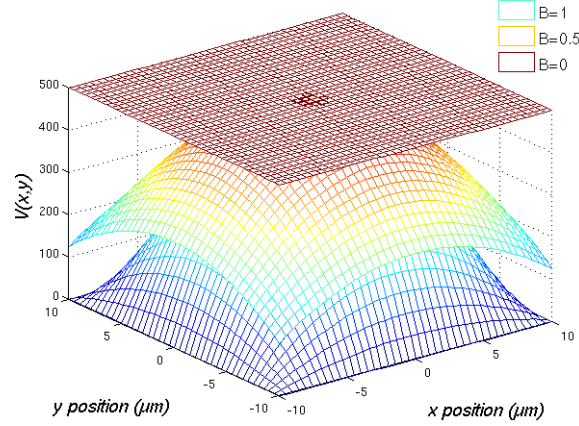


FIGURE 3.3.1: **Formes des profils de vitesse 3D de globules rouges** déduite de la forme du profil de vitesse maximale ($V(x, 0)$) obtenu par *dual-slit*, B est le paramètre d'aplatissement du profil, x la position transversale dans le canal et y la position dans la profondeur du canal, $W = D = 20\mu\text{m}$ ici. Avec $V_0 = 0,5\text{ mm/s}$ et 3 valeurs différentes de B .

où $Q_{GR}(\text{comptage})$ est le débit mesuré par comptage et Q_{GR} est le débit mesuré à partir du profil de vitesse maximale et de l'hématocrite. Cette erreur est en moyenne de 22,7% dans les canaux de section $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$, et de 14,03 % dans les canaux de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$. Cette différence de précision semble liée à l'incertitude lors de la mesure de la section des canaux qui est d'autant plus grande que le canal est petit.

Par ailleurs, nous avons également effectué des calculs d'erreur relative pour Q_{GR} mesuré à partir du profil de vitesse maximale et de l'hématocrite, en prenant en compte les incertitudes sur la vitesse mesurée par *dual-slit*, sur le paramètre B , sur la mesure de la section du canal et sur la mesure d'hématocrite. Ces calculs sont détaillés en Annexe C et nous donnent une erreur relative $\Delta Q_{GR}/Q_{GR}$ égale à 8,9% en moyenne dans les canaux de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ et égale à 28,8% en moyenne dans les canaux de section $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. Nous retrouvons la même tendance, avec des incertitudes plus grandes dans les canaux de plus petite section. Nous utilisons ces calculs d'incertitude (Annexe C) pour représenter les barres d'erreurs dans nos résultats de mesures de débits de globules rouges dans des micro-bifurcations (section 5.3).

Les résultats présentés figure 3.3.2 permettent de valider la méthode de détermination du débit de globules rouges à partir du profil de vitesse et de l'hématocrite par comparaison à une méthode de référence, le comptage des globules rouges. Cette comparaison confirme, outre les arguments théoriques présentés en section 3.1, que la vitesse mesurée par *dual-slit* est bien la vitesse maximale, par une approche expérimentale. Par ailleurs, elle suggère que la déduction du profil de vitesse 3D des globules rouges dans un micro-canal de section carrée à partir du profil de vitesse maximale obtenu par *dual-slit* est pertinente, dans la limite des incertitudes de mesure.

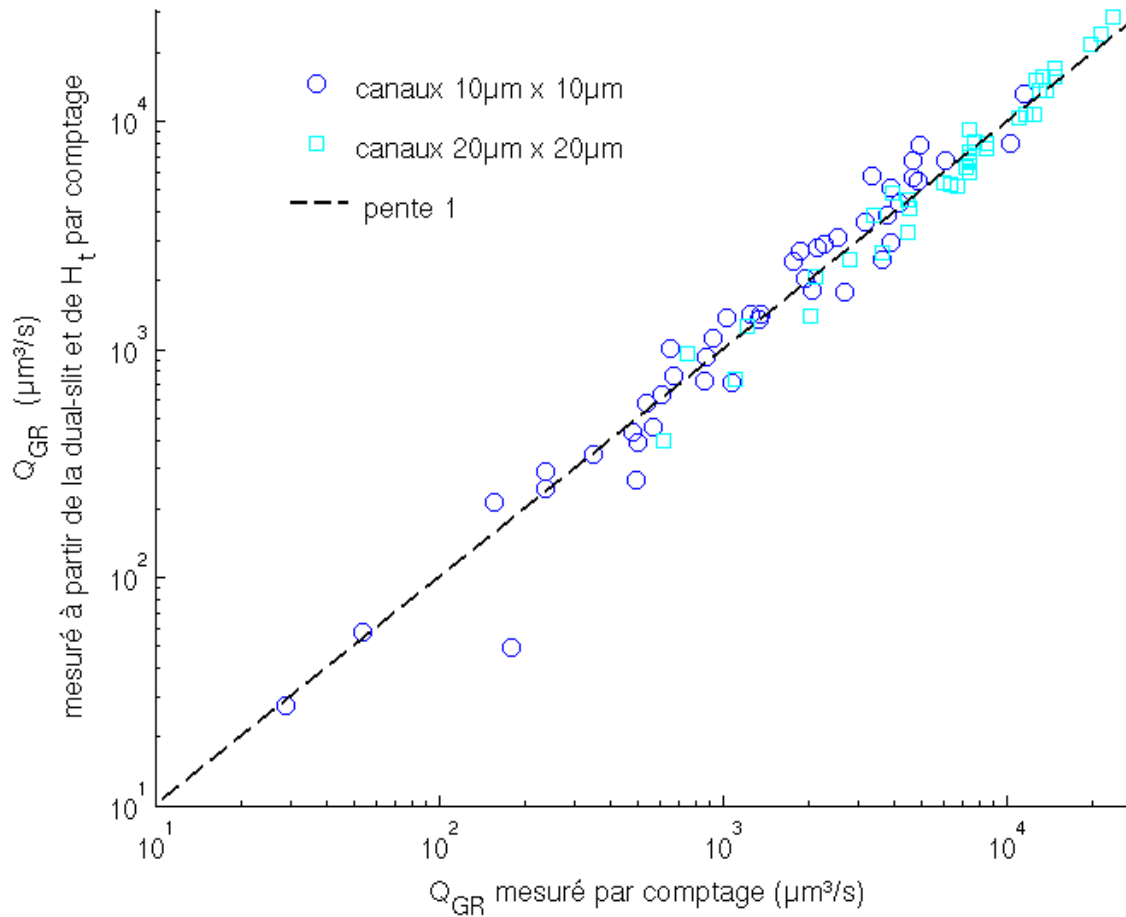


FIGURE 3.3.2: Débit de globules rouges obtenu à partir du profil de vitesse et de l'hématocrite en fonction du débit de globules rouges obtenu par comptage. Les cercles bleus foncé correspondent aux mesures effectuées dans les micro-canaux de section $10\mu m \times 10\mu m$ et les carrés bleus clair à celles effectuées dans les micro-canaux de section $20\mu m \times 20\mu m$, la droite pointillée représente la fonction identité.

3.3.2 Débit de fluide suspendant

Nous nous intéressons maintenant au débit de fluide suspendant dans nos micro-canaux de section carrée. Pour un tube de $100\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre et pour un hématoците de 20%, Sugii et al. (2005) ont montré que les globules rouges et le plasma avancent à la même vitesse maximale, avec un profil de vitesse parabolique pour le plasma. Nous faisons donc l'hypothèse que le fluide suspendant est newtonien et que sa vitesse maximale est égale à celle des globules rouges, V_0 . La fraction volumique de fluide suspendant est, quant à elle, égale à $(1 - H_t)$. La figure 3.3.3 présente un exemple de profils de vitesse des globules rouges et le profil de vitesse hypothétique du fluide suspendant pouvant être obtenus dans un canal de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$. Le débit de fluide suspendant peut être calculé à partir de ces hypothèses.

Dans un canal de section carrée et pour un fluide newtonien Patzek and Silin (2001) ont montré que le rapport entre la vitesse maximale du fluide et sa vitesse moyenne vaut 2,0963. Nous utilisons alors la vitesse V_0 mesurée par *dual-slit* et la relation suivante pour calculer le débit de fluide suspendant :

$$Q_f = \frac{V_0}{2,0963} \times W^2 \times (1 - H_t). \quad (3.3.6)$$

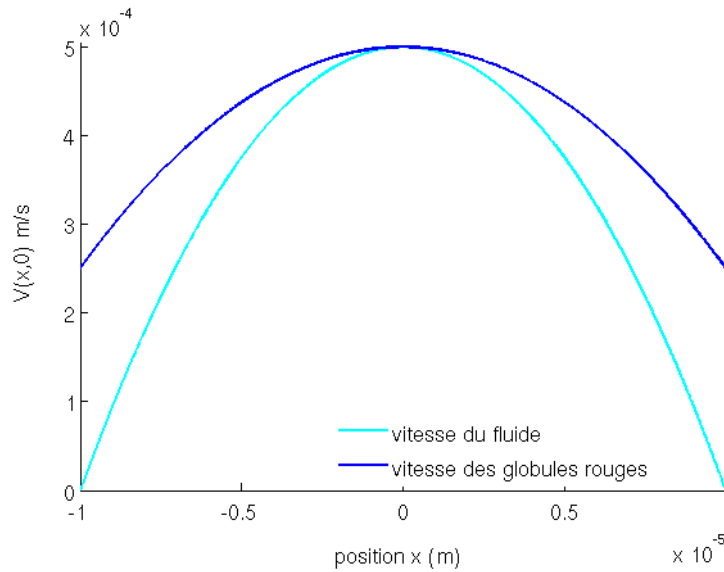


FIGURE 3.3.3: Exemple de profil de vitesse des globules rouges et profil de vitesse du fluide suspendant qui en est déduit ($V_0 = 500\mu\text{m/s}$, $W = 20\mu\text{m}$, et $B = 0,5$)

3.4 Conclusion

Différentes métrologies ont été développées dans le cadre de micro-écoulements de globules rouges. La technique de *dual-slit*, qui a été validée et optimisée, est applicable quelles que soient les gammes de concentrations, de vitesses et pour toutes les tailles de canaux utilisées dans notre étude. Elle permet de mesurer la vitesse maximale des globules rouges dans la profondeur du canal. Concernant les mesures d'hématocrite de tube, la méthode de comptage peut être utilisée pour toutes les tailles de canaux, à condition que l'hématocrite ne soit pas trop élevé, typiquement 8 % dans un canal de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et 13% dans un canal de section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$. La méthode d'évaluation de l'hématocrite à partir d'une mesure de la densité optique est adaptée pour les canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et des hématocrite n'excédant pas 18%. Pour finir, la méthode par déduction est applicable lorsque H_t peut être déterminé par comptage dans deux des trois branches d'une bifurcation.

La méthode de mesure du débit de globules rouges à partir de leur profil de vitesse et de l'hématocrite a été validée par comparaison à une méthode de référence (comptage). Par ailleurs, dans le chapitre suivant, la vérification du principe de conservation de la masse appliqué aux débits de globules rouges, de fluide suspendant et du mélange des deux, entre les trois branches d'une bifurcation, nous donnera une confirmation de la validité de nos méthodes de mesure de débits.

Les profils de vitesses pour des écoulements de globules rouges dans des micro-canaux droits de différentes tailles, pour de larges gammes d'hématocrites et de débits, sont également présentés dans le chapitre suivant.

3.5 Bibliographie

- Chen, B., F. Guo, and H. Xiang (2011). Visualization study of motion and deformation of red blood cells in a microchannel with straight, divergent and convergent sections. *Journal of Biological Physics* 37(4), 429–440.
- Lipowsky, H. H., S. Usami, S. Chien, and R. R. N. Pittman (1980). Hematocrit determination in small bore tubes from optical-density measurements under white-light illumination. *Microvasc Res* 20(1), 51–70.
- Patzek, T. and D. Silin (2001). Shape factor and hydraulic conductance in noncircular capillaries i. one-phase creeping flow. *Journal of Colloid and Interface Science* 236(2), 295–304.
- Pittman, R. and M. Ellsworth (1986). Estimation of red-cell flow in microvessels- consequences of the baker-wayland spatial averaging model. *Microvasc Res* 32(3), 371–388.

- Pries, A., G. Kanzow, and P. Gaehtgens (1983). Microphotometric determination of hematocrit in small vessels. *American Journal of Physiology* 245(1), 167–177.
- Sugii, Y., R. Okuda, K. Okamoto, and H. Madarame (2005). Velocity measurement of both red blood cells and plasma of in vitro blood flow using high-speed micro piv technique. *Meas Sci Technol* 16, 1126–1130.

Chapitre 4

Écoulements sanguins en micro-canaux : résultats

Dans ce chapitre, nous présentons tout d'abord les résultats relatifs au principe de conservation de la masse. Ces résultats sont obtenus par l'association des métrologies décrites dans le chapitre précédent, ils apportent des éléments de validation supplémentaire à ceux décrits précédemment (cf. chapitre 3, sections 3.1, 3.3.1.3). Ces résultats permettent également de discuter du modèle retenu pour décrire les profils de vitesse du fluide suspendant. Dans un second temps, nous présentons les profils de vitesse maximale de globules rouges, pour différentes tailles de canaux, et de larges gammes de concentration et de vitesses, montrant l'existence de différents régimes d'écoulement.

4.1 Mesures de débits et conservation de la masse

Nous évaluons dans cette section les mesures de débits dans les micro-canaux de section carrée. Nous nous intéressons à l'application du principe de conservation de la masse aux débits de globules rouges (Q_{GR}), aux débits de fluide suspendant (Q_f) et aux débits de sang total ($Q_{tot} = Q_{GR} + Q_f$). Pour cela, nous comparons le débit mesuré dans la branche d'entrée d'une micro-bifurcation à la somme des débits mesurés dans les deux branches filles.

L'objectif est de vérifier si nos méthodes de mesure de débit, et donc indirectement nos méthodes de mesure de profil de vitesse et d'hématocrite, sont fiables et d'évaluer les erreurs de mesure.

L'erreur relative est calculée dans les différents cas considérés comme étant égale à :

$$E_i = \frac{|Q_i^e - (Q_i^1 + Q_i^2)|}{Q_i^e}, \quad (4.1.1)$$

où Q_i^e est le débit dans la branche d'entrée, Q_i^1 et Q_i^2 sont les débits dans les branches

filles.

Les résultats sont tracés en échelle logarithmique afin de visualiser facilement les larges gammes de débits mesurées.

4.1.1 Conservation des débits de globules rouges

4.1.1.1 Mesure du débit par comptage

Les résultats sont présentées en figure 4.1.1. Il s'agit ici d'écoulements peu concentrés ($H_t = 1$ à 13%) obtenus dans un des quatre types de micro-bifurcations dont nous disposons. L'erreur relative est en moyenne de 8,2 %, indiquant un accord satisfaisant entre les valeurs de débits entrants et sortants dans les micro-bifurcations étudiées.

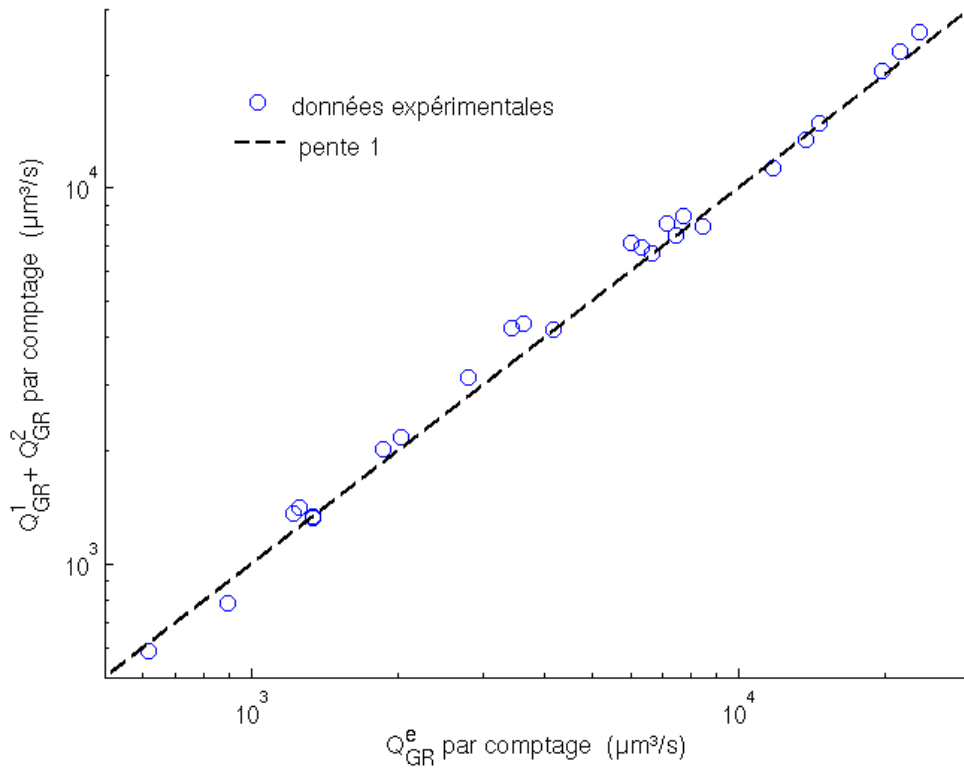


FIGURE 4.1.1: **Conservation du débit de globules rouges mesuré par comptage.** Somme des débits de globules rouges mesurés dans les branches filles en fonction du débit mesuré dans la branche mère lorsque les débits sont mesurés par comptage.

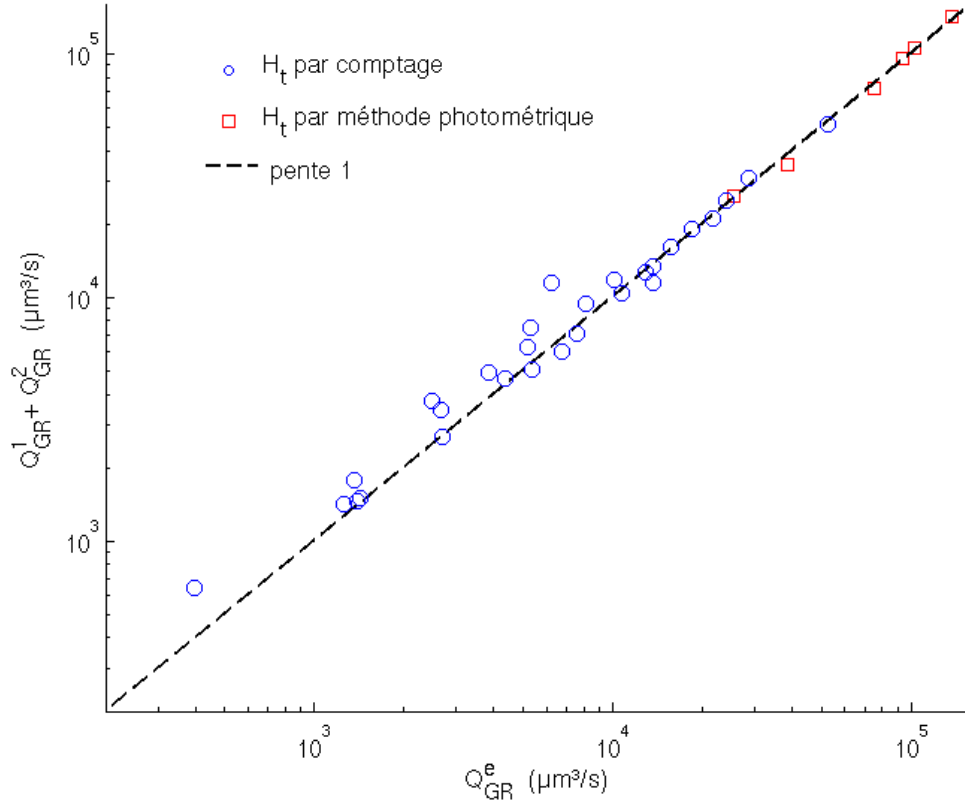


FIGURE 4.1.2: **Conservation du débit de globules rouges, selon la méthode de détermination de l'hématocrite.** Somme des débits de globules rouges mesurés dans les branches filles en fonction du débit mesuré dans la branche mère lorsqu'ils sont mesurés à partir des résultats de *dual-slit* et d'hématocrite. Les cercles bleus correspondent aux données expérimentales pour lesquelles l'hématocrite a été déterminé par comptage des globules rouges, les carrés rouges correspondent aux données pour lesquelles l'hématocrite a été déterminé par la méthode photométrique.

4.1.1.2 Mesure du débit à partir du profil de vitesse des globules rouges (obtenu par *dual-slit*) et de l'hématocrite de tube

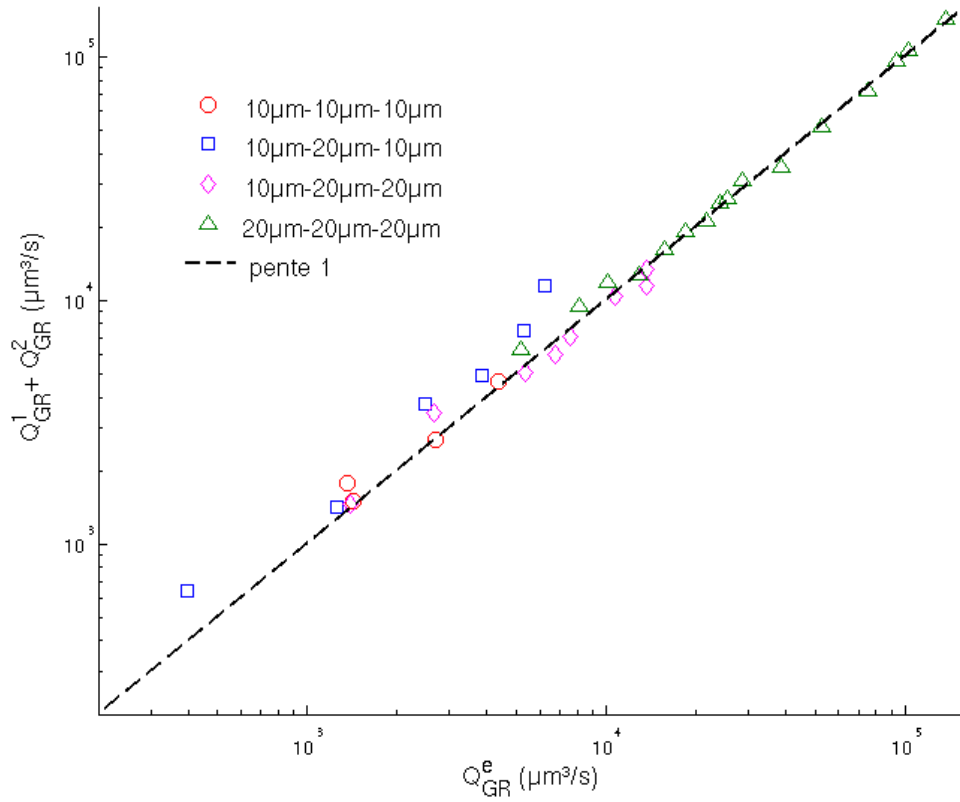
Nous nous intéressons d'abord à l'influence de la méthode de mesure d'hématocrite de tube utilisée, ces résultats sont présentés en figure 4.1.2. Les marqueurs bleus correspondent aux points expérimentaux pour lesquels l'hématocrite a été déterminé par comptage dans toutes les branches de la bifurcation, et les marqueurs rouges aux points pour lesquels l'hématocrite a été déterminé par la méthode photométrique dans 2 ou 3 branches de la bifurcation. Ces résultats nous montrent que pour l'ensemble des mesures il y a un accord satisfaisant entre les débits de globules rouges sortants et le débit entrant. Par ailleurs, même si nous disposons de moins de points expérimentaux pour lesquels l'hématocrite a été déterminé par la méthode photométrique, nous pouvons toutefois constater que l'erreur relative avec cette technique est seulement de 4,16% en moyenne. Avec la méthode de comptage, l'erreur relative est supérieure et égale à 16,9% en moyenne.

Ces résultats mettent en évidence la fiabilité des mesures d'hématocrite par la méthode photométrique, jusqu'à $H_t = 16\%$. Cependant, cette méthode est adaptée uniquement aux canaux de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, pour lesquels l'incertitude sur la taille du canal est la plus faible, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent.

Toutefois, quelques points, où l'hématocrite est mesuré par comptage, s'éloignent assez fortement de la fonction identité. C'est pourquoi nous nous intéressons, dans un second temps, à l'influence du type de micro-bifurcation. Les résultats sont présentés en figure 4.1.3, où les mêmes points expérimentaux que précédemment sont tracés avec des marqueurs différents selon le type de micro-bifurcation utilisé. Il apparaît alors clairement que c'est pour les bifurcations $10\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$ que les points s'éloignent le plus de la fonction identité. Les erreurs relatives moyennes sont respectivement de 10,5%, 46,3%, 9,87% et 6,35% pour les bifurcations $10\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ et $20\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ (cf. table 4.1).

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de ces différentes imprécisions. Tout d'abord, nous avons remarqué que les erreurs sont plus grandes quand la bifurcation est composée majoritairement de canaux de section $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ par rapport à des canaux de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$. Dans la section 3.3 nous avons souligné que les plus grandes incertitudes dans les petits canaux peuvent venir d'erreurs sur la mesure de la section du micro-canal.

Par ailleurs, les grandes erreurs trouvées pour les micro-bifurcations $10\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$ peuvent en partie être expliquées par le fait que lors de l'enregistrement d'une séquence d'images de l'écoulement, nous choisissons la fréquence et le temps d'acquisition en fonction de la vitesse de l'écoulement, pour s'assurer d'être dans les conditions optimales d'utilisation de la *dual-slit* (voir section 3.1). Or dans le cas d'une bifurcation $10\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$, pour une répartition des débits symétrique, la vitesse moyenne de l'écoulement est deux fois plus élevée dans les branches filles de section $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ que dans la branche mère de section plus grande. En calculant les paramètres V_{im} et D_{acq} qui nous permettent de savoir si nous sommes dans les conditions optimales d'ap-



plication de la *dual-slit* (cf. section 3.1), nous constatons *a posteriori* que la valeur de D_{acq} est trop petite pour mesurer des vitesses dans la branche d'entrée d'une bifurcation 10 μ m-20 μ m-10 μ m, alors que ses valeurs pour les branches filles de ce type de bifurcations et pour les autres types de bifurcation sont convenables. En examinant les courbes de la vitesse mesurée par *dual-slit* V_{ds} en fonction de la distance entre les slits L_s , nous voyons effectivement que la courbe présente beaucoup de « sauts » vers les petites valeurs de vitesse pour des mesures dans le canal d'entrée d'une bifurcation 10 μ m-20 μ m-10 μ m, montrant que le calcul de l'intercorrélation n'a pas convergé. De plus, pour toutes nos bifurcations 10 μ m-20 μ m-10 μ m, $(Q_1 + Q_2) > Q_e$, cela traduit bien le fait que la vitesse des globules rouges est sous-estimée dans le canal d'entrée, certainement à cause des sauts de V_{ds} vers les petites valeurs dans les courbes de V_{ds} en fonction de L_s .

4.1.1.3 Débits de globules rouges : conclusion

Les différentes méthodes utilisées pour mesurer les débits de globules rouges dans nos micro-canaux, qui s'appuient sur les méthodes de mesure de l'hématocrite et des profils de vitesse, apparaissent donc satisfaisantes, avec toutefois de grandes erreurs de mesure pour le type de bifurcation 10 μ m-20 μ m-10 μ m. Pour ce dernier type de micro-bifurcations, le problème vient des mesures dans la branche d'entrée, nous envisageons donc, pour la suite, de considérer $\tilde{Q}_{GR}^e = Q_{GR}^1 + Q_{GR}^2$, où \tilde{Q}_{GR}^e est la valeur corrigée (ou déduite) du débit dans la branche d'entrée.

$E_i(\%)$	H_t par comptage	H_t par photométrie
Q_{GR}	16,9	4,16
Q_f	9,6	6,7
Q_{tot}	9,1	5,7

$E_i(\%)$	10 μ m-10 μ m-10 μ m	10 μ m-20 μ m-10 μ m	10 μ m-20 μ m-20 μ m	20 μ m-20 μ m-20 μ m
Q_{GR}	10,5	46,3	9,9	6,3
Q_f	4,8	18,7	11	5,5
Q_{tot}	4,5	17,5	10,3	5,1

TABLE 4.1: **Erreurs relatives entre les débits entrants et sortants d'une bifurcation**, lorsqu'ils sont mesurés à partir des résultats de *dual-slit* et d'hématocrite. Le premier tableau différencie les méthodes de mesure de l'hématocrite, quelque soit le type de bifurcation. Le deuxième différencie le type de micro-bifurcation, quelque soit la méthode de détermination de l'hématocrite.

4.1.2 Conservation des débits de fluide suspendant

Nous considérons à présent les débits de fluide suspendant. Comme précédemment, nous traçons d'abord les débits sortants en fonction du débit entrant dans une bifurcation

en utilisant des marqueurs différents selon la méthode de détermination de l'hématocrite, qui permet d'évaluer la fraction de fluide. Ces résultats sont présentés sur la figure 4.1.4. Puis nous analysons ces mêmes données en fonction du type de micro-bifurcation, figure 4.1.5.

Comme dans le cas des débits de globules rouges, l'erreur relative moyenne est plus grande (9,6%) quand la méthode de comptage pour déterminer l'hématocrite est utilisée, l'erreur est de 6,7% avec la méthode photométrique.

Concernant la figure 4.1.5, ici aussi les erreurs sont plus grandes pour les micro-bifurcations de type 10 μ m-20 μ m-10 μ m, ce qui n'est pas étonnant puisque le débit de fluide est mesuré en partie à partir de la vitesse V_0 déterminée par *dual-slit*. Pour la suite, nous considérons également une valeur corrigée du débit de fluide suspendant : $\tilde{Q}_f^e = Q_f^1 + Q_f^2$.

Les erreurs relatives selon le type de bifurcations sont en moyenne égales à 4,77% pour les bifurcations 10 μ m-10 μ m-10 μ m, 18,7% pour les 10 μ m-20 μ m-10 μ m, 11% pour les 10 μ m-20 μ m-20 μ m, et 5,54% pour les 20 μ m-20 μ m-20 μ m (cf. table 4.1).

Ces résultats nous donnent une validation de notre méthode de mesure du débit de fluide, malgré les hypothèses fortes qui ont été faites. En effet, la méthode de calcul (cf. section 3.3.2) ne nous garantissait pas, à première vue, que la conservation des débits de fluide suspendant serait bien respectée, notamment car cette méthode n'implique pas de rapport de proportionnalité entre Q_{GR}^i et Q_f^i .

4.1.3 Conservation des débits totaux : mélange globules rouges-fluide

Logiquement, si nous nous intéressons à la conservation du débit du mélange constitué des globules rouges et du fluide suspendant, les remarques sont les mêmes que précédemment. L'erreur relative est en moyenne de 9% quelque soit le type de bifurcation lorsque l'hématocrite est déterminé par comptage, elle est de 5,5% quand l'hématocrite est mesuré par la méthode photométrique, voir figure 4.1.6. Lorsque nous regardons les résultats par type de bifurcation, les erreurs sont respectivement de 4,5%, 17,6%, 10,3% et 5,1% pour les micro-bifurcations 10 μ m-10 μ m-10 μ m, 10 μ m-20 μ m-10 μ m, 10 μ m-20 μ m-20 μ m et 20 μ m-20 μ m-20 μ m (cf. table 4.1). Ces résultats sont cohérents avec les résultats précédemment décrits.

4.1.4 Déviation à la conservation de la masse

Lorsque Cokelet et al. (1998) se sont intéressés à la précision des techniques utilisées pour mesurer l'écoulement du sang, ils ont analysé *in vivo* le rapport entre les débits de globules rouges entrant et sortant d'une bifurcation et le rapport des débits de sang (globules rouges et fluide suspendant) entrant et sortant de la bifurcation. Ils avaient alors montré que ces rapport peuvent varier de 0,1 à 10, ce qui correspond à de grandes

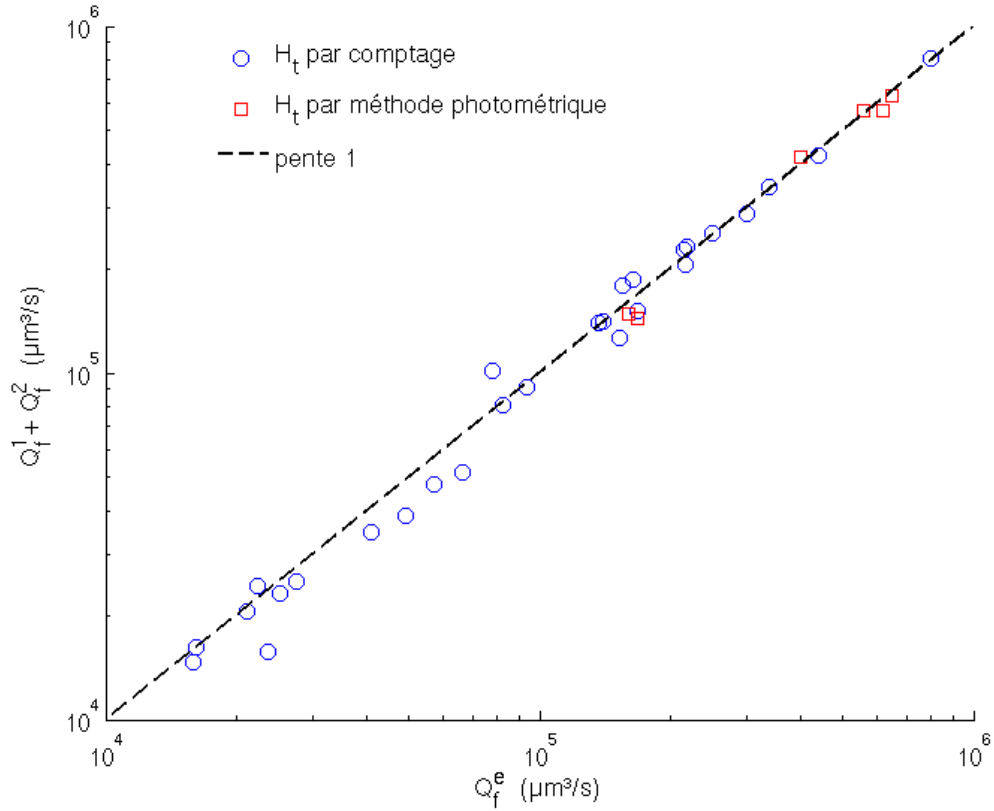


FIGURE 4.1.4: **Conservation du débit de fluide suspendant, selon la méthode de détermination de l'hématocrite.** Somme des débits de fluide suspendant dans les branches filles en fonction du débit dans la branche mère. Les cercles bleus correspondent aux données expérimentales pour lesquelles l'hématocrite a été déterminé par comptage des globules rouges. Les carrés rouges correspondent aux données pour lesquelles l'hématocrite a été déterminé par la méthode photométrique (la fraction de fluide est égale à $1 - H_t$).

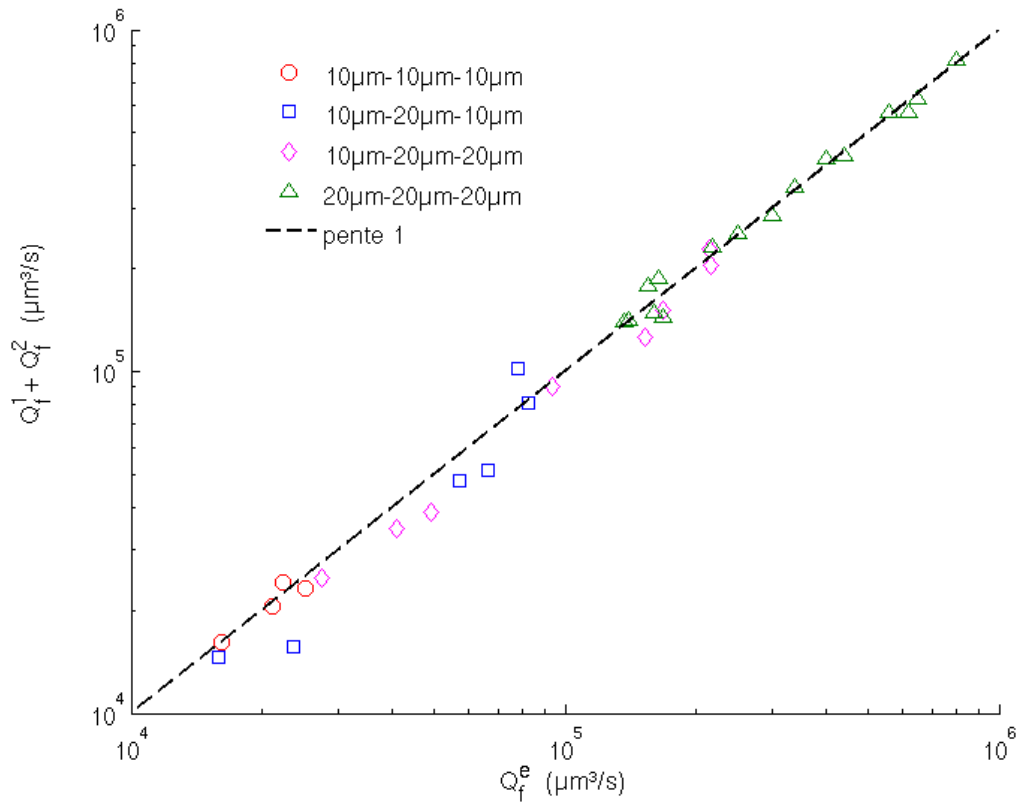


FIGURE 4.1.5: **Conservation du débit de fluide suspendant, selon le type de micro-bifurcation.** Somme des débits de fluide suspendant dans les branches filles en fonction du débit dans la branche mère. Les différents marqueurs correspondent aux différentes micro-bifurcations dans lesquelles ont été mesurés les débits.

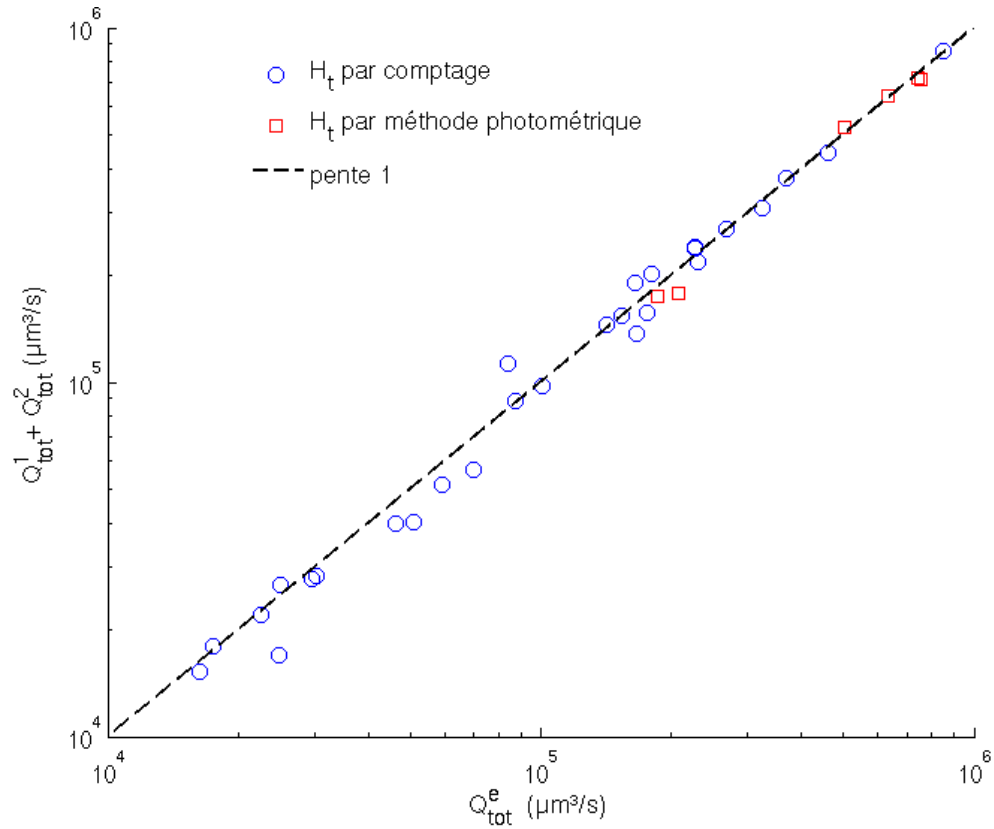


FIGURE 4.1.6: **Conservation du débit du mélange globules rouges/ fluide suspendant selon la méthode de détermination de l'hématocrite.** Somme des débits du mélange dans les branches filles en fonction du débit dans la branche mère. Les cercles bleus correspondent aux données expérimentales pour lesquelles l'hématocrite a été déterminé par comptage des globules rouges. Les carrés rouges correspondent aux données pour lesquelles l'hématocrite a été déterminé par la méthode photométrique.

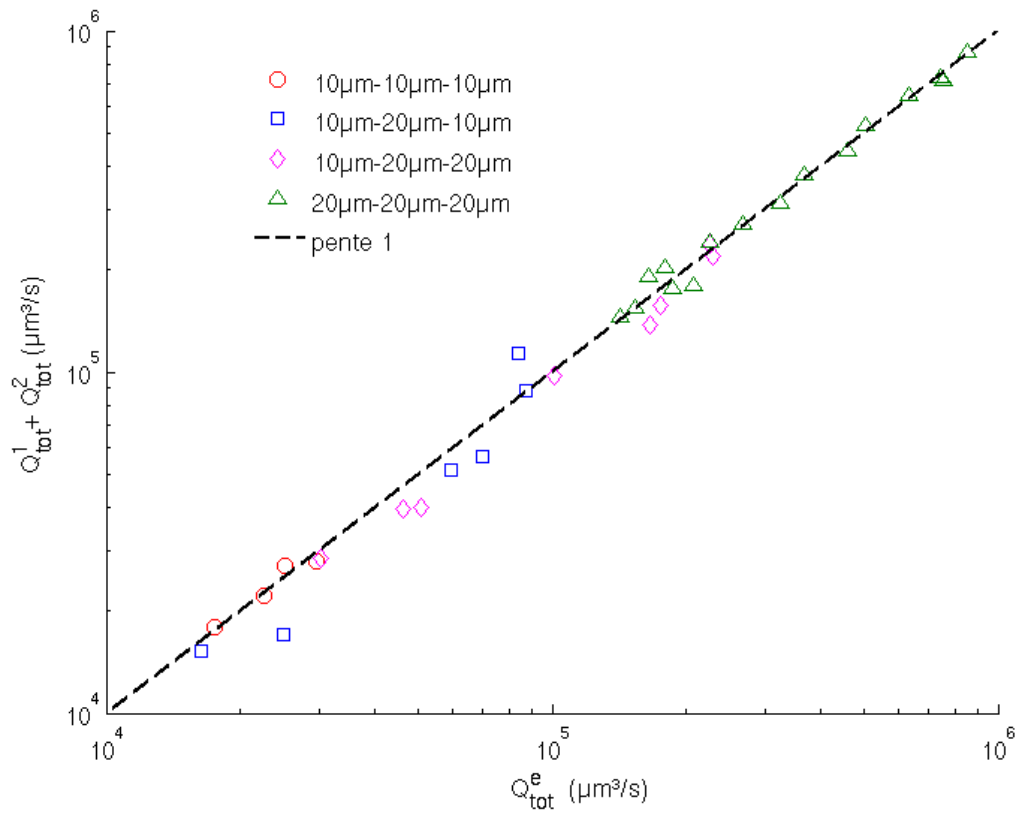


FIGURE 4.1.7: Conservation du débit du mélange globules rouges/ fluide suspendant, selon le type de micro-bifurcation. Somme des débits du mélange dans les branches filles en fonction du débit dans la branche mère. Les différents marqueurs correspondent aux différentes micro-bifurcations dans lesquelles ont été mesurés les débits.

erreurs de mesure. Nous traçons également ces points pour toutes les bifurcations dont nous disposons, voir figure 4.1.8, et nous comparons ces données à celles de Cokelet et al. (1998) obtenues pour des études *in vivo*. Nous voyons que nos points expérimentaux sont concentrés autour de la valeur 1, reflétant ainsi la fiabilité de nos mesures quantitatives. Toutefois, il y a une famille de points pour laquelle la déviation au principe de conservation de la masse est plus importante, il s'agit des points correspondants à la géométrie de bifurcation 10 μ m-20 μ m-10 μ m (carrés bleus) avant la correction ($\hat{Q}_f^e = Q_f^1 + Q_f^2$) décrite ci-dessus (section 4.1.1), pour lesquels nous avons identifié que les paramètres d'application de la *dual-slit* ne sont pas optimaux dans la branche d'entrée. Malgré ce problème, nos résultats en termes de précision de mesure sont très supérieurs aux données recueillies par Cokelet et al. (1998) pour toutes les géométries étudiées.

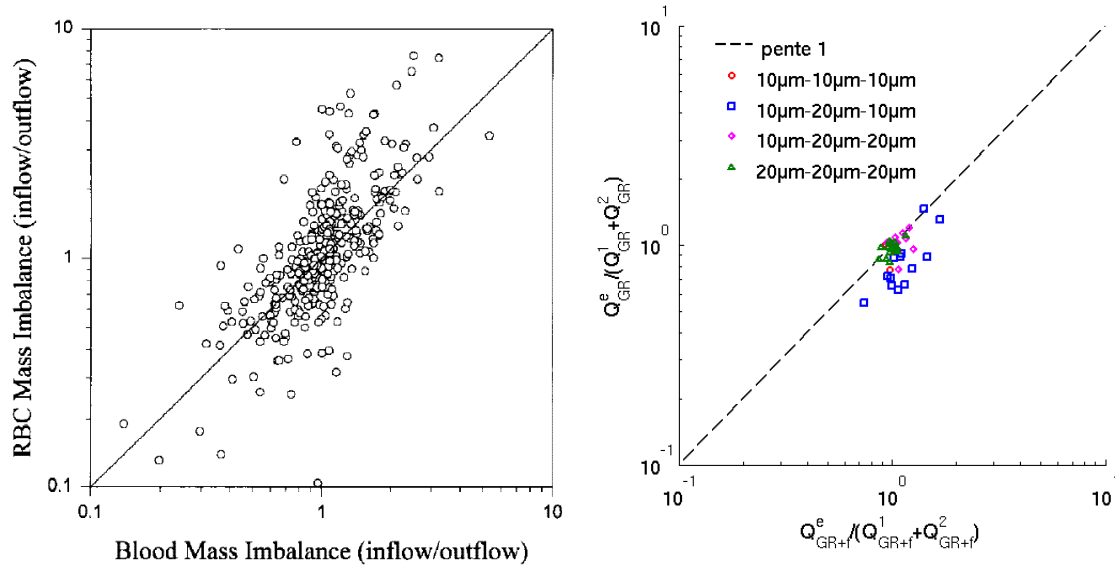


FIGURE 4.1.8: **Déviati  n à la conservation de la masse** : rapport des débits mesurés entrant et sortant de globules rouges en fonction du rapport des débits mesurés entrant et sortant du mélange globules rouges/fluide suspendant au niveau de micro-bifurcations. A gauche : données *in vivo* recueillis par Cokelet et al. (1998), à droite : données *in vitro* sur nos micro-bifurcations.

4.1.5 Mesures de débits : conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre valident les méthodes de mesure des écoulements de globules rouges en micro-canaux. La tableau 4.1 reprend les erreurs relatives calculées dans cette section entre le débit entrant et les débits sortants d'une micro-bifurcation.

Les résultats ci-dessus mettent en évidence que, dans la limite des incertitudes de mesure, le profil de vitesse du fluide suspendant peut être déduit simplement à partir de

la vitesse maximale des globules rouges (cf. section 3.3.2). Les hypothèses de ce modèle sont que le fluide suspendant est newtonien, et qu'il avance à la même vitesse maximale que les globules rouges. Le profil de vitesse du fluide suspendant est ensuite décrit grâce aux équations de Patzek and Silin (2001).

Nous analysons à présent les profils de vitesse de globules rouges obtenus grâce à la technique de *dual-slit*, dans des micro-canaux de différentes tailles.

4.2 Profils de vitesse des globules rouges

Les profils de vitesse maximale présentés dans cette section sont obtenus en appliquant la technique de *dual-slit* à des écoulements de suspensions de globules rouges *in vitro*, dans une large gamme de vitesses et d'hématocrites. Les données expérimentales correspondantes ont été acquises soit dans des micro-canaux uniques droits, soit dans les micro-canaux d'une bifurcation considérés de façon individuelle. Les résultats sont présentés ci-dessous pour des canaux de section décroissante ($100\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ et $50\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$, puis $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, puis $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$).

4.2.1 Globules rouges dans des micro-canaux de faible rapport d'aspect

Nous nous intéressons dans un premier temps aux profils de vitesse maximale de globules rouges circulants dans les canaux d'alimentation de nos micro-systèmes, qui sont plus larges que profonds. Dans ces canaux, le rapport d'aspect est petit ($D/W = 0,2$), et les profils de vitesse des globules rouges montrent une forme aplatie au centre du canal, quelque soit l'hématocrite de tube et la vitesse maximale (figure 4.2.1). Une telle forme de profil de vitesse a été décrite auparavant par Lima et al. (2008), dans le cas de canaux en PDMS rectangulaire de section $300\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$ pour un hématocrite de 20%, étudiés par micro-PIV, avec toutefois une résolution spatiale de mesures moindre que celle obtenue avec la *dual-slit*.

Les profils de vitesse, présentés sur la figure 4.2.1, montrent un plateau plus ou moins large au centre du canal où la vitesse est égale à la vitesse maximale dans la canal ($V_{max}(x) = V_0$) et deux arcs de paraboles reliant ce plateau à la vitesse de glissement aux parois. Dans le but de comparer les différents profils, nous avons déterminé trois paramètres par un ajustement des données : V_0 , la vitesse au centre, B qui définit la vitesse de glissement aux parois (égale à $(1 - B) \times V_0$), et α qui correspond à la largeur du plateau pour lequel $V_{max}(x) = V_0$, en % de la largeur du canal. Les profils de vitesse sont décrit par l'équation suivante :

$$V_{max}(x) = \begin{cases} V_0 & \text{si } -\alpha^* \leq x \leq \alpha^* \\ ax^2 + bx + c & \text{si } x < -\alpha^* \\ ax^2 - bx + c & \text{si } x > \alpha^* \end{cases} \quad (4.2.1)$$

Avec :

$$\alpha^* = D/2 \times \alpha/100 \text{ (}\mu\text{m)},$$

$$a = \frac{-BV_0}{(R - \alpha^*)^2},$$

$$b = 2a\alpha^*$$

$$c = V_0 (1 - \alpha^*)^2 B \times \frac{1}{(R - \alpha^*)^2}.$$

Afin de simplifier la comparaison des profils de la figure 4.2.1, les vitesses sont normalisées par V_0 .

La figure 4.2.1 (A) présente des profils de vitesse de globules rouges obtenus dans des canaux de section $100\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ pour différents hématocrites et différentes vitesses. La figure 4.2.1 (B) montre un profil de vitesse des globules rouges dans un canal $50\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. Sa forme est similaire aux profils rencontrés dans les canaux $100\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$. Dans ce type de canaux à faible rapport d'aspect, nous n'avons pas assez de données pour établir une éventuelle corrélation entre les paramètres V_0 , B , α et H_t , toutefois quelques tendances qualitatives se dégagent. Notons que nous n'avons pas de méthode de mesure quantitative de l'hématocrite pour ces tailles de canaux, autre que la méthode par comptage des globules rouges. Quoiqu'il en soit, nous pouvons souligner que pour un écoulement très lent et très concentré (figure 4.2.1, A2), le plateau où $V_{max}(x) = V_0$ est très large. De plus, la vitesse de glissement aux parois (V_g) a tendance à être plus petite lorsque la suspension de globules rouges est plus concentrée (figure 4.2.1, A2 : $V_g = 0,38 \times V_0$ et A4 : $V_g = 0,3 \times V_0$). Le paramètre B serait donc d'autant plus grand que l'hématocrite est grand.

4.2.2 Globules rouges dans des micro-canaux à section carrée

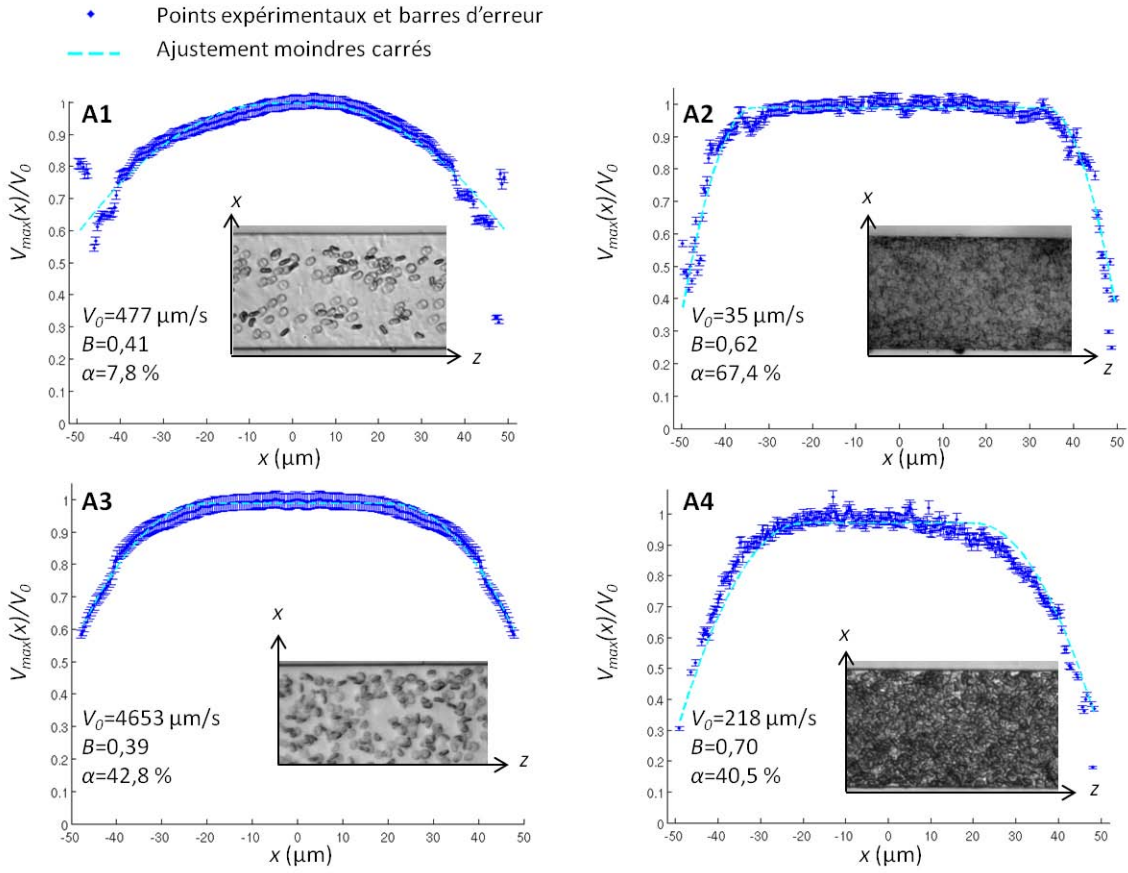
4.2.2.1 Micro-canaux $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$

Dans les micro-canaux à section carrée, le profil de vitesse maximale obtenu avec la technique de *dual-slit*, peut être décrit par l'équation 3.1, rappelée ci-dessous :

$$V_{max}(x) = V_0 \left(1 - B \left(\frac{x}{W/2} \right)^2 \right).$$

Les 95 séquences d'images d'écoulement de globules rouges, dont nous disposons pour ces micro-canaux, nous donnent un profil de vitesse qui est ajusté avec cette équation, afin de déterminer V_0 et B . De plus, l'hématocrite de tube (H_t) a été déterminé grâce à l'une des méthodes décrites dans la section 3.2.

(A)



(B)

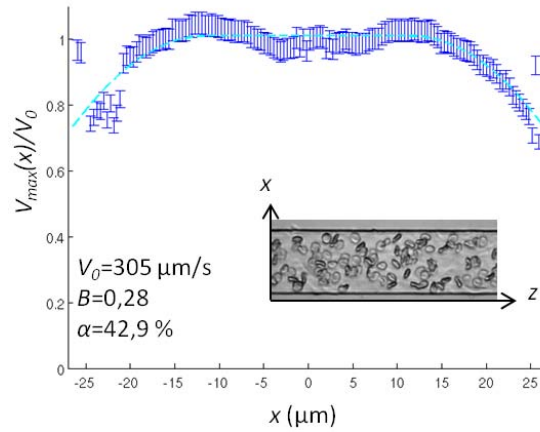


FIGURE 4.2.1: **Profils de vitesse maximale des globules rouges dans des micro-canaux larges**, pour différentes vitesses et différents hématocrites. Les données expérimentales sont ajustées avec la méthode des moindres carrés pour déterminer la vitesse au centre, V_0 , le paramètre B tel que la vitesse de glissement aux parois soit égale à $(1 - B) \times V_0$, et α qui définit la largeur du plateau $V_0(x) = V_0$ (en pourcentage de la largeur du canal). (A) Canaux $100\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, (B) Canal $50\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$.

Pour l'ensemble de ces données expérimentales, l'hématocrite de tube mesuré est compris entre 0,7 et 22 %. Les vitesses V_0 mesurées vont de 25 à plus de 6000 $\mu\text{m/s}$, pour des fréquences d'acquisition comprises entre 500 et 10000 fps. Le paramètre qui caractérise l'aplatissement du profil, B , varie quant à lui, de 0,05 à 0,57, et il vaut 0,30 en moyenne, ce qui décrit un profil assez aplati en moyenne.

La figure 4.2.2 présente des exemples de ces profils de vitesse pour différentes vitesses et hématocrites, les vitesses sont normalisées par V_0 .

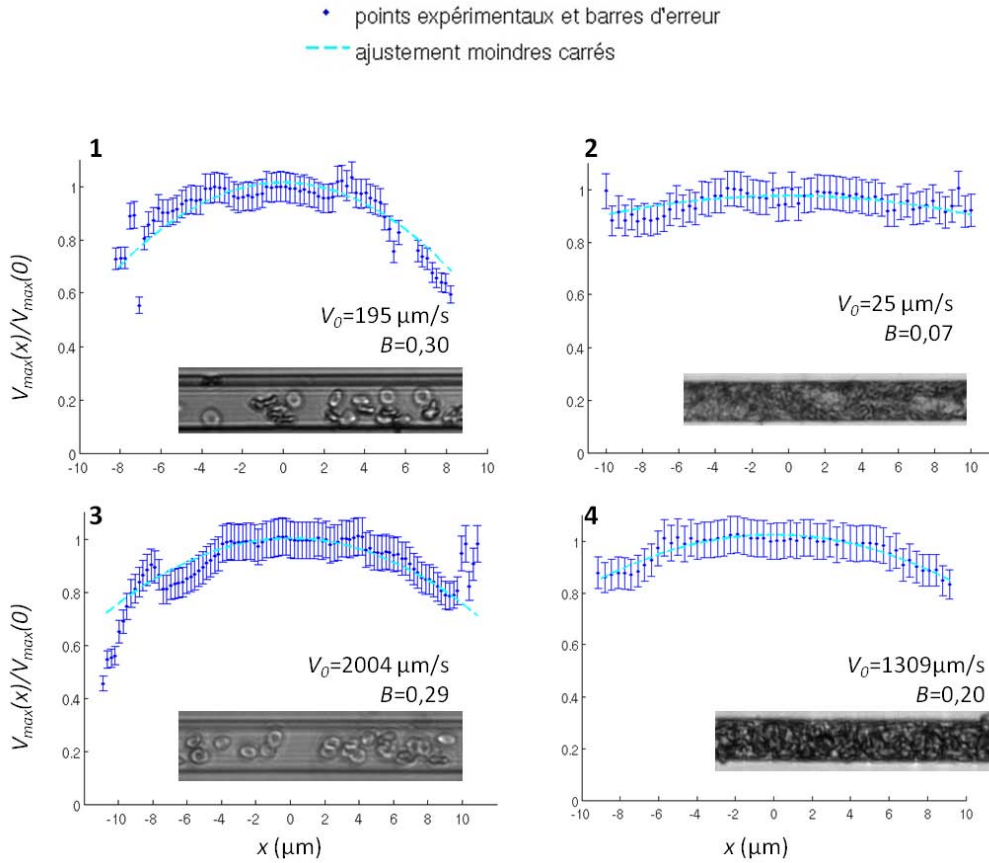


FIGURE 4.2.2: **Profils de vitesse des globules rouges dans des micro-canaux de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ et images de l'écoulement.** 1 : $H_t = 1,8 \%$, 2 : $H_t = 20 \%$, 3 : $H_t = 2,8 \%$, 4 : $H_t = 22 \%$.

L'équation 3.1, que nous utilisons pour décrire ces profils de vitesse, et pour mesurer nos débits de globules rouges, peut être sujette à discussion. Notamment car elle a été initialement proposée pour un canal cylindrique (Pittman and Ellsworth, 1986). Il peut être montré que le profil de vitesse d'un fluide newtonien dans un canal carré de côté a , est très proche du profil dans un canal cylindrique de diamètre a (Patzek and Silin, 2001). En partant de ce constat, et du fait que le calcul des débits à partir de cette description simple du profil de vitesse a été validée (section 4.1), cette représentation du

profil de vitesse des globules rouges semble adéquate et suffisante pour notre étude.

4.2.2.2 Petit micro-canal : section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$

Nous nous penchons maintenant sur l'étude des écoulements de globules rouges dans de petits micro-canaux, de section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$. Comme dans le cas précédent, les profils de vitesse sont ajustés avec l'équation 3.1 afin de déterminer V_0 et B . Pour les 55 profils de vitesses que nous avons obtenus dans ces petits canaux, l'hématocrite de tube mesuré par comptage est compris entre 0,1 et 18 %. Les vitesses V_0 mesurées vont de 7 et 1421 $\mu\text{m/s}$, pour des fréquences d'acquisition variant de 100 à 4000 fps. Le paramètre d'aplatissement du profil, B , est compris entre 0 à 0,11, ce qui se traduit par un profil de vitesse plat. La figure 4.2.3 présente quelques uns des profils de vitesse de globules rouges dans ces micro-canaux. Nous pouvons voir que, quelque soit la vitesse ou l'hématocrite, les profils ont une forme similaire. En effet, la taille de la section du canal est proche de la taille d'un globule rouge. Il n'y a donc pas de gradient de vitesse des globules rouges à l'intérieur d'un canal de section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$.

4.2.2.3 Influence de la vitesse maximale et de l'hématocrite sur la forme du profil de vitesse

Nous nous sommes ensuite intéressés aux variations de la forme du profil de vitesse, caractérisée par le paramètre d'aplatissement B , avec V_0 et H_t . La figure 4.2.4 présente les variations de B avec H_t , obtenues pour toutes les conditions expérimentales, c'est-à-dire quelle que soit la vitesse V_0 . Tout d'abord cette figure confirme que nous observons deux régimes d'écoulements distincts qui dépendent de la taille du micro-canal. En effet, les gammes de B mesurées ne sont pas les mêmes pour les canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$. D'autre part, les mesures sont très dispersées mais semblent montrer une augmentation de B avec H_t . Ceci a été confirmé par une étude statistique des valeurs expérimentales de B , à l'aide d'un test t de Student (Sokal and Rohlf, 1994), dont le résultat est présenté figure 4.2.5. Une différence significative ($p < 0,05$) a été trouvée entre la valeur moyenne de B dans l'intervalle d'hématocrite 0-8% et la valeur moyenne de B dans l'intervalle 8-16%, et ce pour les canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$. Si nous nous intéressons aux variations de B avec V_0 quel que soit H_t (figure 4.2.6) nous constatons aussi une grande dispersion des mesures, dont l'amplitude diminue avec V_0 .

Ces résultats laissent présager qu'outre V_0 et H_t , d'autres paramètres sont nécessaires pour décrire l'écoulement. Par exemple, la taille de la couche d'exclusion plasmatique aux parois du canal (que nous ne sommes pas capables de mesurer dans la présente étude) pourrait intervenir dans la description de l'écoulement.

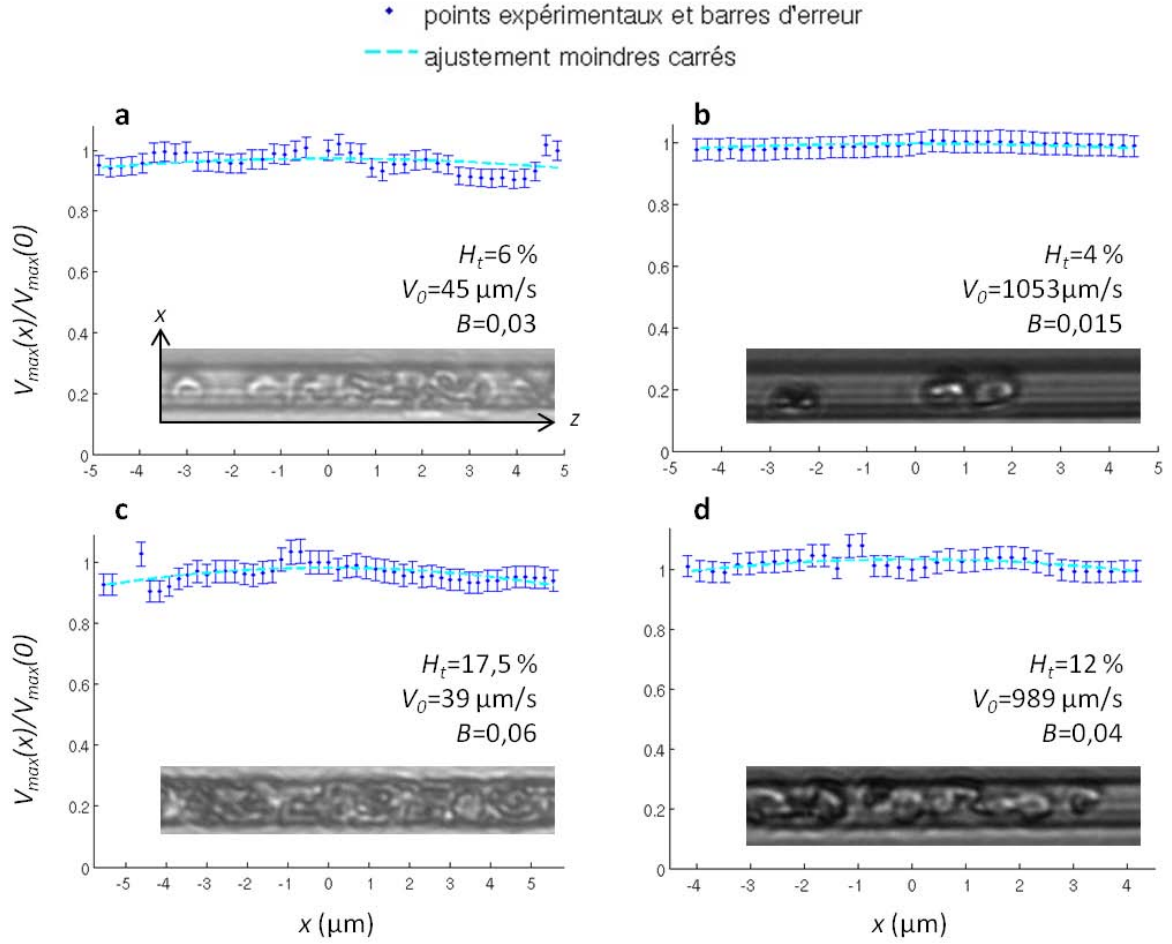


FIGURE 4.2.3: **Profils de vitesse des globules rouges dans des micro-canaux de section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ et images de l'écoulement**, pour différents hématocrites et vitesses. Profils a et b : hématocrite peu élevé pour une vitesse faible (a) et une vitesse élevée (b), profils c et d : hématocrite assez élevé pour une vitesse faible (c) et une élevée (d).

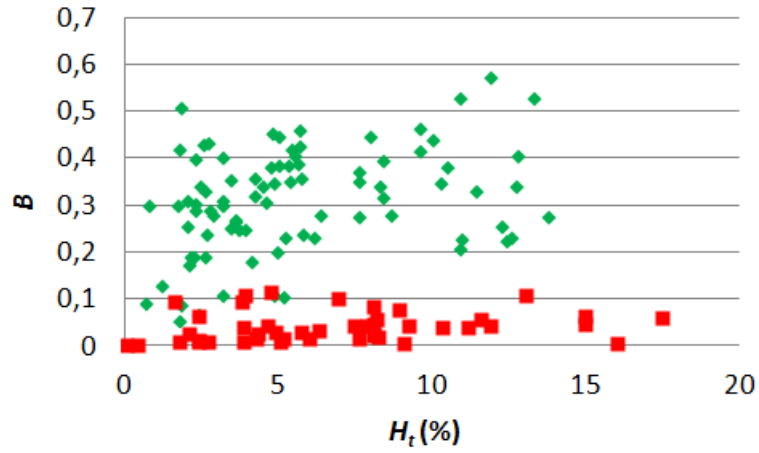


FIGURE 4.2.4: **Variations de B avec H_t quel que soit V_0** pour les micro-canaux de section $20\mu m \times 20\mu m$ (vert) et les micro-canaux de section $10\mu m \times 10\mu m$ (rouge).

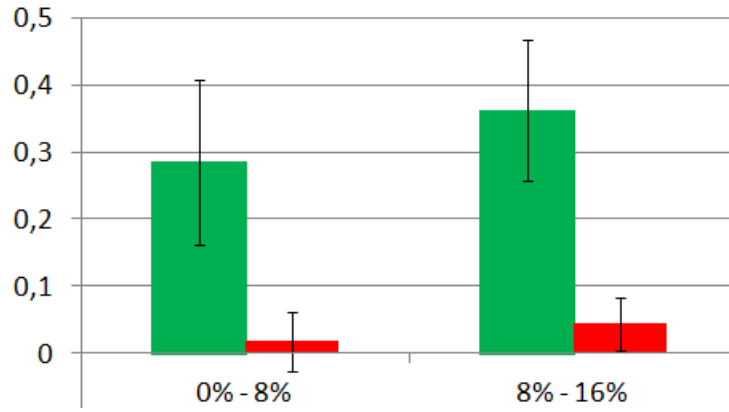


FIGURE 4.2.5: **Moyenne et écart type des valeurs de B** pour l'intervalle d'hématocrite allant de 0 à 8% et celui allant de 8 à 16% pour les micro-canaux de section $20\mu m \times 20\mu m$ (vert) et les micro-canaux de section $10\mu m \times 10\mu m$ (rouge), test statistique : $p < 0,05$.

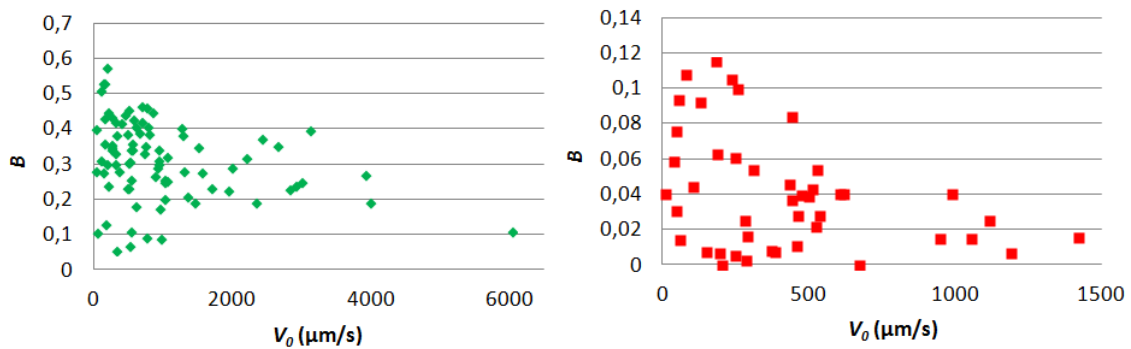


FIGURE 4.2.6: **Variations de B avec V_0 quel que soit H_t** pour les micro-canaux de section $20\mu m \times 20\mu m$ (gauche) et les micro-canaux de section $10\mu m \times 10\mu m$ (droite).

4.2.2.4 Globules rouges circulants en agrégats

Dans la section 2.1.1, nous avons mentionné la fabrication de micro-canaux uniques, droits, de sections $5\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$, $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$, et $40\mu\text{m}\times 40\mu\text{m}$. Il s'est avéré que nous n'avons pas pu exploiter les micro-canaux de section $5\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}$. Le protocole de photolithographie utilisé n'est pas adapté à cette petite taille de canaux. La conséquence a été que la couche de résine, de très faible épaisseur sur le moule, s'est décollée au niveau de la petite section des canaux.

Comme nous venons de le voir, nous nous sommes principalement focalisés sur l'étude des écoulements dans les canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$, car ce sont les tailles de canaux que nous retrouvons dans nos micro-bifurcations.

Quant aux micro-canaux de section $40\mu\text{m}\times 40\mu\text{m}$, ils nous ont servi lors de l'acquisition des premiers films d'écoulement de globules rouges, il était, en effet, plus facile de mettre en place le protocole expérimental sur ces plus grands canaux. Plus la section d'un canal est petite, plus nous pouvons rencontrer de problèmes lors du moulage en PDMS (canaux bouchés, cassés) et plus les impuretés peuvent obstruer le micro-canal, lorsqu'un fluide y est injecté.

Nous disposons donc de quelques films d'écoulement dans ces canaux de section $40\mu\text{m}\times 40\mu\text{m}$, dont tous ne sont pas exploitables. En effet, lors de ces expériences préliminaires, nous ne connaissions pas encore les conditions d'application de la *dual-slit*. Par ailleurs, nous utilisons, à ce moment, un autre milieu que l'Optiprep pour garantir l'isodensité de nos suspensions (cf. section 2.3). Il s'est avéré que ce premier milieu favorise l'agrégation des globules rouges, ce que nous ne souhaitons pas. De ce fait, ces premières expériences nous permettent de présenter, sur la figure 4.2.7, un profil de vitesse de globules rouges s'écoulant en agrégats dans un canal de section $40\mu\text{m}\times 40\mu\text{m}$. Ce profil est ajusté avec l'équation 3.1, comme attendu, le profil est plat ($B = 0,06$) car les globules rouges passent par « paquets » circulants à la même vitesse. Nous constatons également sur la photo de la figure 4.2.7 la présence d'une couche d'exclusion plasmatiche aux parois du canal, que nous n'observons pas pour des écoulements de globules rouges sans agrégation.

4.2.3 Profils de vitesse de globules rouges : conclusion

Les profils de vitesses présentés dans cette section montrent la capacité de la technique de *dual-slit* à fournir des profils précis de vitesse maximale, pour des micro-canaux de différentes tailles, pour des hématocrites pouvant être très petits (0,1%), ou au contraire pour des suspensions concentrées (de l'ordre de 30 %), et pour une large gamme de vitesse des globules rouges. Les profils de vitesse de globules rouges observés sont similaires à ceux décrits auparavant, pour des suspensions de globules rouges *in vitro*, ou *in vivo*. La technique de *dual-slit* permet également de mesurer la vitesse de glissement des globules rouges au niveau des parois des micro-canaux ce qui n'était pas possible, à notre connaissance, avec les autres techniques de mesure. Deux régimes d'écoulements

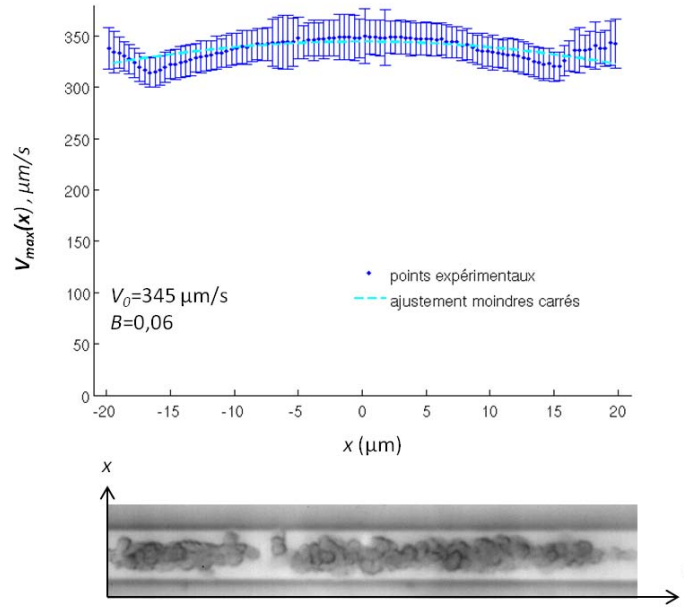


FIGURE 4.2.7: **Profil de vitesse de globules rouges agrégés dans un canal de section $40\mu\text{m}\times 40\mu\text{m}$ et image de l'écoulement.**

des globules rouges, qui dépendent de la taille du micro-canal, ont été mis en évidence. Un premier régime correspondant aux canaux de taille du même ordre que celle des globules rouges ($10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$), où le profil est plat. Et un second régime, dans des canaux de taille supérieure, où l'écoulement présente des gradients de vitesse avec un profil aplati. Dans les deux régimes, nous avons observé que la vitesse de glissement des globules rouges aux niveaux des parois est d'autant plus petite que l'hématocrite est grand, ce qui se traduit par une augmentation de B avec H_t .

C'est à partir de ces profils de vitesses obtenus dans les canaux de section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ et $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et des mesures d'hématocrite que nous avons déterminé les débits de globules rouges, de fluide suspensif, et du mélange.

Par ailleurs, même si la technique de *dual-slit* est plus adaptée à l'étude de suspensions de globules rouges, qui forment des motifs diversifiés favorables au calcul de l'intercorrélation, elle a permis de réaliser des mesures d'écoulements de suspensions diluées de particules de latex, dans un objectif de validation d'une technique d'interférométrie par rétroinjection optique (cf. 1.3.1.2). Ceci a été réalisé en marge de ce travail (cf. Annexe D).

Conclusion

Dans le chapitre suivant les métrologies développées et validées sont appliquées à l'étude paramétrique de l'effet de séparation de phase *in vitro*. Nous mesurons simul-

tanément dans les trois branches d’une micro-bifurcation, le débit de globules rouges, le débit de fluide suspendant et l’hématocrite, afin d’étudier le débit fractionnaire de globules rouges (Q_{GR}^i/Q_{GR}^e) qui entre dans la branche fille i de la bifurcation en fonction du débit fractionnaire de sang total (Q_{tot}^i/Q_{tot}^e) entrant dans cette même branche.

4.3 Bibliographie

- Cokelet, G., A. Pries, and M. Kiani (1998). Observations on the accuracy of photometric techniques used to measure some in vivo microvascular blood flow parameters. *Microcirculation - London* 5(1), 61–70.
- Lima, R., S. Wada, S. Tanaka, M. Takeda, T. Ishikawa, K.-i. Tsubota, Y. Imai, and T. Yamaguchi (2008). In vitro blood flow in a rectangular pdms microchannel : experimental observations using a confocal micro-piv system. *Biomed Microdevices* 10(2), 153–167.
- Patzek, T. and D. Silin (2001). Shape factor and hydraulic conductance in noncircular capillaries i. one-phase creeping flow. *Journal of Colloid and Interface Science* 236(2), 295–304.
- Pittman, R. and M. Ellsworth (1986). Estimation of red-cell flow in microvessels- consequences of the baker-wayland spatial averaging model. *Microvasc Res* 32(3), 371–388.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf (1994). *Biometry* (third ed.).

Chapitre 5

Effet de séparation de phase au niveau de micro-bifurcations

La séparation de l'écoulement du plasma et de celui des globules rouges dans des capillaires a été initialement observée *in vivo* par Krogh (1922), qui a montré que certains capillaires reçoivent très peu de globules rouges par rapport au nombre de globules rouges circulant dans la branche amont (branche mère). Krogh a attribué ce phénomène à la présence de la couche d'exclusion plasmatique aux parois du vaisseau mère (cf. Chapitre 1, section 1.1.4), suivant le principe représenté figure 5.0.1. La couche d'exclusion plasmatique du vaisseau mère alimente préférentiellement le vaisseau fille de plus petite taille, dans lequel la fraction volumique de globules rouges est alors inférieure à celle de la branche d'entrée. En conséquence, Krogh appelle ce phénomène *plasma skimming*. Il observe également que le *plasma skimming* est d'autant plus marqué que la différence de débit entre la branche mère et la branche fille, qui reçoit un plus petit hématocrite, est grande. La conséquence principale du *plasma skimming* est que les globules rouges et le plasma ne sont pas distribués uniformément dans un réseau capillaire constitué d'un grand nombre de bifurcations successives. Il induit ainsi une grande hétérogénéité des hématocrites et des vitesses à l'échelle d'un réseau. Krogh rapporte même que certains capillaires peuvent se retrouver dépourvus de globules rouges. Se posent alors les questions de la signification physiologique du phénomène de séparation de phase, des lois physiques qui interviennent, voire des facteurs biologiques qui peuvent l'influencer.

Le présent chapitre est consacré à l'étude de l'effet de séparation de phase aux bifurcations microvasculaires divergentes. Nous introduisons ce chapitre par un état de l'art résumant les précédents travaux menés pour comprendre et caractériser ce phénomène. Nous décrivons ensuite la méthode d'étude de l'effet de séparation de phase retenue dans ce travail, qui, dans la continuité des chapitres précédents, est basée sur la quantification d'écoulements sanguins *in vitro* au niveau de micro-bifurcations divergentes. Enfin, nous présentons les résultats obtenus.

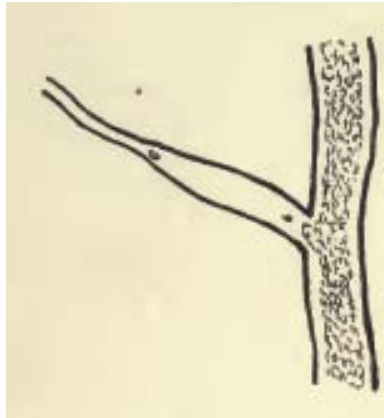


FIGURE 5.0.1: **Phénomène de séparation de phase, schématisé par Krogh (1922)**, un capillaire adjacent à une artériole reçoit très peu de globules rouges en provenance de cette artériole.

5.1 Effet de séparation : état de l'art

Les nombreux travaux expérimentaux, réalisés *in vivo* ou *in vitro*, qui ont eu pour but de quantifier et de comprendre les causes de l'effet de séparation de phase sont tout d'abord résumés, ainsi que les relations empiriques issues de ces travaux. Nous présentons aussi le développement de modèles d'écoulements au niveau de bifurcations en lien avec cette problématique. Pour finir, nous discutons de l'implication de l'effet de séparation de phase dans la dynamique des écoulements sanguins microvasculaires et de la nécessité de clarifier la compréhension de ce phénomène.

5.1.1 Études expérimentales de l'effet de séparation de phase

Les premières mesures quantitatives de l'hématocrite dans la microcirculation (Johnson, 1971) ont montré que les vaisseaux où la vitesse des globules rouges est plus grande présentent un hématocrite plus élevé que les autres vaisseaux. Par ailleurs, les études *in vivo* de Klitzman and Duling (1979); Duling and Dam (1987); Ley et al. (1988) ont révélé que l'hématocrite capillaire moyen est inférieur à l'hématocrite systémique et que l'hématocrite est très hétérogène d'un vaisseau à l'autre dans un réseau microvasculaire. C'est à partir de ces observations que s'est dégagée la volonté d'étudier plus finement l'écoulement sanguin au niveau d'une bifurcation microvasculaire divergente unique.

Une étude approfondie de la distribution des globules rouges et du plasma aux bifurcations microvasculaires a été réalisée *in vivo* par Klitzman and Johnson (1982), en mesurant simultanément le débit sanguin et le débit de globules rouges dans les trois branches d'une bifurcation. Ils ont étudié l'écoulement sanguin dans des capillaires de 5 μm de diamètre en moyenne ($\pm 0,3\mu\text{m}$) chez le hamster, pour qui les globules rouges ont un diamètre de 5,6 μm en moyenne. Les auteurs se sont typiquement intéressés aux

variations de la proportion du débit de globules rouges entrant dans une des branches filles notée i ($F_{GR}^i = Q_{GR}^i/Q_{GR}^e$), en fonction de la proportion du débit de sang total entrant dans cette même branche ($F_{tot}^i = Q_{tot}^i/Q_{tot}^e$)¹. L'hypothèse de Klitzman and Johnson (1982) est que les globules rouges vont préférentiellement dans la branche fille de plus grand débit volumique. Pour traduire cette hypothèse, Klitzman and Johnson (1982) introduisent pour la première fois la fonction *logit* afin de décrire les variations du *débit fractionnaire* de globules rouges F_{GR} en fonction du débit fractionnaire de sang F_{tot} :

$$\text{logit}(F_{GR}) = b \text{logit}(F_{tot}), \quad (5.1.1)$$

où

$$\text{logit}(x) = \ln\left(\frac{x}{1-x}\right). \quad (5.1.2)$$

Cette relation implique que les variations de F_{GR} en fonction de F_{tot} suivent une courbe sigmoïde, symétrique autour du point $(0,5; 0,5)$ et passant par les points $(0; 0)$ et $(1; 1)$, ce qui traduit le fait qu'un vaisseau dans lequel l'écoulement est nul ne peut pas recevoir de globules rouges. La courbe passe également par le point $(0,5; 0,5)$ car selon Klitzman and Johnson (1982), les globules rouges devraient se distribuer également lorsque le débit de sang total est également répartie entre les deux branches filles d'une bifurcation. Lorsque le paramètre b est égal à 1, l'effet de séparation de phase est inexistant et le débit fractionnaire de globules rouges correspond à celui de sang total ($F_{GR} = F_{tot}$). Si $b > 1$, les globules rouges vont préférentiellement dans la branche de plus fort débit. La figure 5.1.1 montre les variations de F_{GR} en fonction de F_{tot} pour différentes valeurs de b . Klitzman and Johnson (1982) ont déterminé la valeur de b par régression linéaire avec l'équation 5.1.1 à partir d'un grand nombre d'expériences *in vivo*, et ont trouvé que b vaut 1,15 en moyenne. Cette valeur indique un écoulement préférentiel des globules rouges vers la branche de plus fort débit. D'après ces auteurs, cet écoulement préférentiel des globules rouges dépendrait de la position radiale du globule rouge qui arrive à la bifurcation et du rapport des débits de sang des branches filles, qui joue sur les forces physiques agissant sur les globules rouges à la bifurcation. Notons que dans cette étude le diamètre des globules rouges est 1,14 fois plus grand que le diamètre des capillaires en moyenne et que les globules rouges arrivent un par un à une bifurcation. Klitzman and Johnson (1982) remarquent d'ailleurs que les résultats seraient certainement différents en étudiant des artérioles, dont le diamètre est plus grand que les capillaires.

Paramètres importants pour décrire le phénomène

Les travaux qui ont succédé à ceux de Klitzman and Johnson (1982) ont eu pour but de chercher les paramètres qui influencent l'effet de séparation de phase parmi la quantité considérable de paramètres dont peut dépendre l'écoulement sanguin dans une bifurcation divergente unique. Ces paramètres sont par exemple : la géométrie de la

1. Notons que, par conservation de la masse $F_{GR}^1 + F_{GR}^2 = 1$ et $F_{tot}^1 + F_{tot}^2 = 1$.

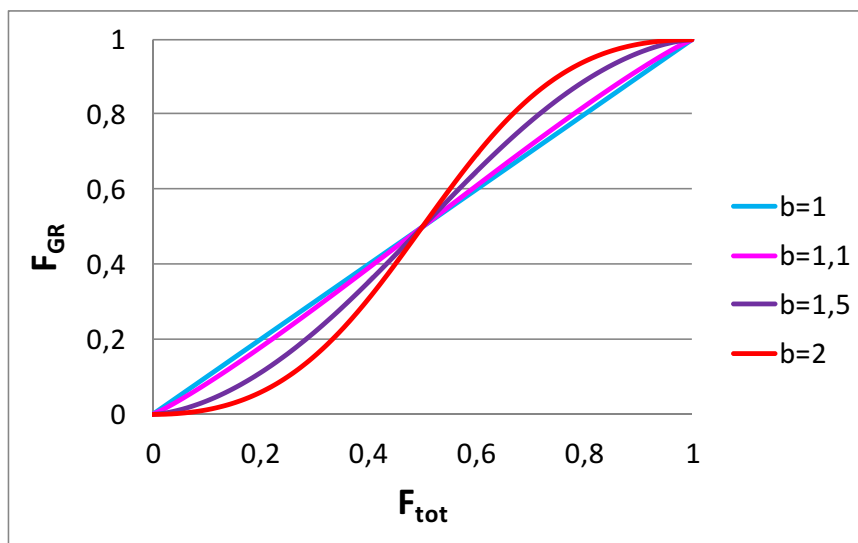


FIGURE 5.1.1: **Fraction de débit de globules rouges qui entre dans une branche de la bifurcation en fonction de la fraction de sang total entrant dans cette même branche**, d'après l'équation 5.1.1, pour différentes valeurs de b (Klitzman and Johnson, 1982).

bifurcation (rapports des diamètres, angle de branchement), la taille des globules rouges par rapport au diamètre des vaisseaux, les vitesses et l'hématocrite dans la branche mère, le rapport des débits des branches filles, la rigidité des cellules, les propriétés du fluide suspendant, etc. Les travaux réalisés *in vitro* par Fenton et al. (1985) pour des bifurcations symétriques où les trois branches ont le même diamètre (20, 50 ou 100 μm) ont permis de déterminer les variables qui apparaissent les plus importantes dans l'effet de séparation de phase. Il s'agit de l'hématocrite dans la branche mère, des diamètres et de la distribution des débits entre les trois branches. Fenton et al. (1985) ont également déterminé le paramètre b dans l'équation 5.1.1 décrite par Klitzman and Johnson (1982), b est compris entre 1,52 et 1,31 pour les bifurcations de diamètre 20 μm . Il est égal à 1,12 quand les diamètres sont de 50 μm et vaut 1,10 quand les diamètres sont de 100 μm . En particulier, plus l'hématocrite est petit dans la branche mère, plus l'effet est marqué (plus b est grand), comme l'avaient déjà remarqué Dellimore et al. (1983) *in vitro*. L'effet de séparation de phase est également d'autant plus marqué que les diamètres des vaisseaux sont petits. D'après les travaux *in vitro* de Carr and Wickham (1991), si le diamètre des vaisseaux composant la bifurcation est supérieur à 50 μm , il n'y a pas d'effet de séparation de phase. De plus, le ratio entre le diamètre de la branche fille (D_i) et de la branche mère (D_e) est plus pertinent dans l'effet de séparation de phase que les valeurs des diamètres des branches. Par ailleurs, contrairement à Klitzman and Johnson (1982), Fenton et al. (1985) ont mis en évidence qu'il existe une valeur seuil de F_{tot} en dessous de laquelle aucun globule rouge ne rentre dans la branche fille ($F_{GR} = 0$), cette valeur seuil dépend des paramètres de l'écoulement.

Relation empirique représentant l'effet de séparation de phase

Pries et al. (1989) ont réalisé des mesures quantitatives *in vivo* dans le but de déterminer une loi empirique caractérisant l'effet de séparation de phase. Les résultats sont présentés en termes de F_{GR} en fonction de F_{tot} , l'allure des courbes est comparable aux tendances décrites par Klitzman and Johnson (1982) et Fenton et al. (1985), à la différence que la courbe sigmoïde peut ne pas être symétrique par rapport au point $(0,5; 0,5)$, car Pries et al. (1989) considèrent des bifurcations non symétriques (les diamètres des branches filles peuvent être différents). Pries et al. (1989) ont proposé de décrire l'effet de séparation de phase en ajoutant un paramètre A à la loi de Klitzman and Johnson (1982) :

$$\text{logit}(F_{GR}) = A + B \text{logit}(F_{tot}). \quad (5.1.3)$$

Ils ont également ajouté un paramètre X_0 , pour signifier l'existence de la valeur seuil de F_{tot} en dessous de laquelle aucun globule n'entre la branche fille. La relation est :

$$F_{GR}^1 = \begin{cases} 0 & \text{si } F_{tot}^1 < X_0 \\ 1 & \text{si } F_{tot}^1 > 1 - X_0 \\ \frac{1}{1 + e^{-\left(A + B \text{logit}\left(\frac{F_{tot}^1 - X_0}{1 - 2X_0}\right)\right)}} & \text{sinon.} \end{cases} \quad (5.1.4)$$

Les paramètres A , B et X_0 sont reliés aux paramètres de l'écoulement par un ajustement aux données expérimentales. Le paramètre A caractérise l'asymétrie de la courbe. Pries et al. (1989) l'ont déterminé par la relation dimensionnelle :

$$A = -6,96 \ln \left(\frac{D_1}{D_2} \right) / D_e. \quad (5.1.5)$$

Les diamètres sont en μm . Ainsi, lorsque la bifurcation est symétrique $A = 0$ et la courbe passe par $(0,5; 0,5)$, sinon la courbe est asymétrique. Le paramètre B décrit la forme sigmoïde de la courbe : plus B est grand, plus la courbe s'éloigne de la droite identité, Pries et al. (1989) ont déterminé :

$$B = 1 + 6,98(1 - H_D^e) / D_e. \quad (5.1.6)$$

Enfin, le paramètre X_0 est la valeur seuil de F_{tot} en dessous de laquelle $F_{GR} = 0$ et vaut (Pries et al., 1989) :

$$X_0 = 0,4 / D_e. \quad (5.1.7)$$

Cette loi empirique, valable chez le rat, peut être transposée à l'Homme en remarquant que ce n'est pas le diamètre absolu des vaisseaux qui est important, mais le rapport entre le diamètre des globules rouges et celui des vaisseaux. Les termes dépendant du diamètre sont donc divisés par la racine cubique du rapport entre le volume du globule rouge chez

l'Homme ($92 \mu m^3$) et chez le rat ($55 \mu m^3$). La loi ainsi obtenue pour l'Homme est :

$$A = -8,26 \ln \left(\frac{D_1}{D_2} \right) / D_e, \quad (5.1.8)$$

$$B = 1 + 8,29(1 - H_D^e) / D_e, \quad (5.1.9)$$

$$X_0 = 0,72 / D_e. \quad (5.1.10)$$

La figure 5.1.2 montre les courbes de F_{GR} en fonction de F_{tot} dans les deux branches filles d'une bifurcation, ainsi que l'hématocrite relatif (H_D^i / H_D^e), obtenus avec le modèle de Pries et al. (1989) pour deux jeux de paramètres. Lorsque la bifurcation n'est pas symétrique, la courbe donnant F_{GR}^1 en fonction de F_{tot} est symétrique à la courbe donnant F_{GR}^2 en fonction de F_{tot} , par rapport au point $(0,5; 0,5)$ (courbe pleines et pointillées sur la figure 5.1.2, A). Ce modèle empirique a, par la suite, été repris pour le comparer à des données expérimentales (Ditchfield and Olbricht, 1996) ou numériques (Barber et al., 2008), ou encore pour modéliser les écoulements sanguins dans un réseau microvasculaire (Pries et al., 1990; Pozrikidis, 2009; Guibert et al., 2010; Lorthois et al., 2011). Toutefois, ce modèle empirique montre des limites, notamment lorsque l'asymétrie de la bifurcation est importante (D_1/D_2 petit), et que l'hématocrite d'entrée, H_D^e , est grand, la relation de Pries et al. (1989) (équation 5.1.4, appliquée à l'Homme) peut alors amener à un hématocrite de débit dans une des branches filles supérieur à 1. En utilisant des valeurs réalistes des paramètres d'entrée (par exemple $D_e = 8 \mu m$, $D_1 = 4 \mu m$, $D_2 = 8 \mu m$, $H_D^e = 0,8$), des valeurs aberrantes d'hématocrite de débit dans la branche de sortie ($H_D^1 = \frac{H_D^e}{F_{tot}^1} F_{GR}^1 > 1$) peuvent être obtenues. Dans l'exemple précédent, ce résultat est obtenu dans la plus fine des branche fille lorsqu'elle reçoit entre 34 et 70% du débit d'entrée ($0,34 < F_{tot} < 0,7$).

D'autre part, pour Pries et al. (1989), contrairement à Ditchfield and Olbricht (1996), il n'y a pas d'effet de l'angle de la bifurcation sur la distribution des débits de globules rouges et de sang.

Plasma skimming et cell screening

Par ailleurs, avec une approche théorique, basée sur le phénomène de *plasma skimming*, qui dit que la distribution des globules rouges aux branches filles d'une bifurcation est une conséquence de la distribution radiale des globules rouges dans le vaisseau mère, Pries et al. (1989) ont mis en évidence que ce phénomène de *plasma skimming* à lui seul ne suffit pas à expliquer l'effet de séparation de phase observé *in vivo*. Le phénomène de *plasma skimming* implique également que les globules rouges suivent la couche de fluide où est situé leur centre de masse. Un autre phénomène, le *cell screening*, interviendrait. Lorsque le diamètre de la branche d'entrée devient petit (*i.e.* inférieur à la taille d'un globule), les globules rouges pourraient alors interagir avec la paroi ou entre eux, et ne

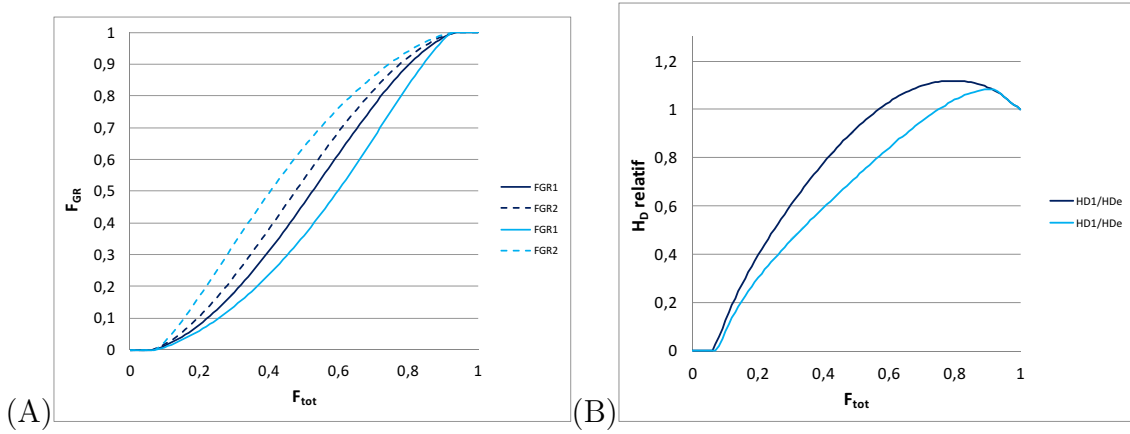


FIGURE 5.1.2: **Modèle de Pries et al. (1989) pour deux jeux de paramètres.** En bleu foncé : $D^e = 12\mu\text{m}$, $D^1 = 10\mu\text{m}$, $D^2 = 8\mu\text{m}$, $H_D = 0,45$, en bleu clair : $D^e = 10\mu\text{m}$, $D^1 = 8\mu\text{m}$, $D^2 = 4\mu\text{m}$, $H_D = 0,7$. (A) Fraction de débit de globules rouges dans une des branches filles (F_{GR}^1 et F_{GR}^2) en fonction de la fraction de sang qui entre dans cette branche (F_{tot}^1 et F_{tot}^2). (B) hématocrite relatif dans une des branches filles (H_D^1/H_D^e et H_D^2/H_D^e) en fonction de la fraction de sang qui entre dans cette branche (F_{tot}^1 et F_{tot}^2).

pas suivre l'écoulement de la couche de fluide où est situé leur centre de masse.

Ces deux phénomènes, le *plasma skimming* et le *cell screening*, ont été étudiés *in vitro* par Ditchfield and Olbricht (1996) à l'aide de particules sphériques qui circulent au niveau d'une bifurcation. Ces auteurs ont plus spécifiquement étudié l'influence des interactions hydrodynamiques entre les particules sur la répartition du fluide et des particules à la bifurcation. Leurs résultats montrent que, lorsque le diamètre des vaisseaux est grand par rapport au diamètre des particules, le phénomène de *plasma skimming* prédomine. La distribution non proportionnelle des particules et du fluide entre les branches filles est alors essentiellement due à la présence d'une zone d'exclusion plasmatique aux parois de la branche mère. Lorsque, au contraire, le diamètre des vaisseaux est du même ordre de grandeur que la taille des particules, les deux phénomènes, *plasma skimming* et *cell screening*, sont importants.

Pour conclure, les différentes études menées précédemment *in vivo* ou *in vitro* ont mis en évidence l'importance de l'hématocrite, de sa distribution dans la branche mère, de la géométrie de la bifurcation (essentiellement le diamètre de la branche mère et le ratio des diamètres des branches filles) et de la distribution des débits de sang entre les branches filles, pour décrire la répartition non proportionnelle des globules rouges et du plasma aux bifurcations microvasculaires.

5.1.2 Modèles d'écoulement aux bifurcations microvasculaires

D'un point de vue numérique, de nombreux auteurs se sont intéressés à décrire ces phénomènes à l'aide de modèles plus ou moins complexes (Perkkio and Keskinen, 1983;

Chien et al., 1985; Enden and Popel, 1994; El-Kareh and Secomb, 2000; Hyakutake et al., 2006; Barber et al., 2008), afin d'analyser les mécanismes physiques mis en jeu au niveau des bifurcations microvasculaires. Ces modèles sont cependant limités par la complexité de l'écoulement tridimensionnel des globules rouges. Même s'ils ne permettent pas de reproduire exactement ce qui est observé *in vivo*, ils apportent toutefois des informations intéressantes sur la physique de l'écoulement aux bifurcations.

Modèles numériques de l'effet de séparation de phase

Enden and Popel (1994) ont, par exemple, mis en évidence qu'avec un modèle simple, qui ne prend en compte que le *plasma skimming* et faisant l'hypothèse d'une distribution spatiale des globules rouges symétrique dans la branche d'entrée et de profils de vitesses paraboliques pour les globules rouges, ils retrouvent le même type de courbes sigmoïdes que Pries et al. (1989) ou Fenton et al. (1985). Ils trouvent cependant quelques différences quantitatives en comparant au modèle empirique de Pries et al. (1989). Dans ces travaux, Enden and Popel (1994) ne prennent pas en compte l'individualité des globules rouges, en simulant des particules par exemple, mais ils étudient un noyau concentrique où les globules rouges seraient uniformément répartis, ce noyau est considéré comme un fluide visqueux homogène.

D'autres travaux s'intéressent plus particulièrement à l'analyse des trajectoires de particules sphériques ou elliptiques qui arrivent à une bifurcation. Les auteurs regardent alors si les globules rouges suivent l'écoulement de la couche de fluide où est positionnée leur centre de masse. El-Kareh and Secomb (2000) montrent que le phénomène de déviation des particules par rapport à la ligne de courant où est positionné leur centre est sensible à l'orientation des particules. Par ailleurs, si les particules constituent une suspension uniforme dans la branche mère (*i.e.* elles n'ont pas d'orientation préférentielle et sont distribuées dans tout le canal), elles suivent les lignes de courant. Ceci est à relier au fait qu'expérimentalement lorsque les particules sont très concentrées dans la branche mère et qu'il n'y a pas de couche d'exclusion plasmatique aux parois, elles suivent l'écoulement du fluide : il n'y a alors pas d'effet de séparation de phase. Les conclusions des travaux de Barber et al. (2008) sur la trajectoire de particules au niveau d'une bifurcation sont similaires : lorsque l'hématocrite est petit, la répartition des particules à la bifurcation est déterminée par la distribution des particules dans le vaisseau mère. Ils montrent également que si les particules sont petites par rapport aux dimensions de l'écoulement, elles suivent les lignes de courant du fluide. Dans le cas contraire, les particules dévient des lignes de courant du fluide.

Ces modèles numériques ont permis de retrouver les grandes tendances de l'écoulement au niveau de bifurcations, mais ils ne permettent pas, à l'heure actuelle, d'extraire une loi quantitative pour décrire l'effet de séparation de phase. La mise en place de modèles plus élaborés restant du domaine de la recherche, nous avons privilégié, pour ces travaux de thèse, la voie expérimentale.

Attraction des globules rouges vers la branche de plus fort débit ?

La plupart des travaux expérimentaux ou numériques soulignent le fait que l'augmentation de la fraction volumique de globules rouges dans la branche de plus fort débit serait due à une « attraction » des globules vers les forts débits. Récemment, Doyeux et al. (2011) ont voulu étudier ce point en détail par une approche à la fois numérique et expérimentale bidimensionnelle, dans le but d'identifier le phénomène hydrodynamique qui conduit certaines des particules sphériques à échapper à la ligne de courant du fluide qu'elles suivent. Pour cela les auteurs ont choisi une bifurcation en forme de T pour éviter les contraintes liées à la position de l'apex d'une bifurcation en forme de Y (Roberts and Olbricht, 2006). En effet, selon l'angle d'une bifurcation en forme de Y, la trajectoire des particules va être impactée différemment au niveau de l'apex de la bifurcation. Doyeux et al. (2011) considèrent des particules circulaires rigides, diluées, qui n'interagissent pas entre elles. Leurs résultats, en termes de position des lignes séparatrices sont présentés sur la figure 5.1.3, dans la cas où $Q_1 < Q_2$. Sur cette figure, y_f représente la position de la ligne séparatrice en l'absence de particules : le fluide situé au dessus de cette ligne s'écoule vers la branche 1 alors que le fluide situé en dessous s'écoule vers la branche 2. Doyeux et al. (2011) ont montré que la position de la ligne séparatrice des particules, y_0^* , est différente de celle du fluide, et plus proche de l'axe de symétrie, signifiant alors que les particules sont attirées par la branche de plus bas débit. Ainsi, d'après ces travaux, deux effets, représentés en figure 5.1.4, entrent en jeu successivement à la bifurcation. La particule est attirée d'abord vers la branche de plus bas débit (1) lorsqu'elle entre dans la bifurcation, selon le mécanisme illustré sur le schéma de gauche de la figure 5.1.4. Puis, arrivée à proximité de la paroi opposée à la branche d'entrée, la particule est attirée vers la branche de plus fort débit (2), selon le mécanisme schématisé à droite sur la figure 5.1.4. Doyeux et al. (2011) présentent également leurs résultats en termes de ratio entre le nombre de particules qui entrent dans une branche fille et le nombre de particules qui entrent dans la branche d'entrée (équivalent à F_{GR} pour les études expérimentales), en fonction du rapport des débits entre la branche fille et la branche d'entrée (équivalent à F_{tot}). Ces résultats pourront être comparés ultérieurement à nos résultats d'écoulement de globules rouges *in vitro* (section 5.3).

Pour conclure, l'étude de Doyeux et al. (2011) montre qu'il peut y avoir localement une attraction des particules vers la branche de plus bas débit, même si le résultat global est un enrichissement de la branche de plus fort débit en particules, principalement dû à la zone de déplétion en particules dans la branche d'entrée. Bien sûr, ce modèle ne prend pas en compte les interactions entre particules qui entrent également en jeu dans la répartition des particules à la bifurcations.

5.1.3 Implications et applications de l'effet de séparation de phase

La caractérisation de l'effet de séparation de phase trouve des applications en microfluidique et est nécessaire à la modélisation des écoulements à l'échelle d'un réseau

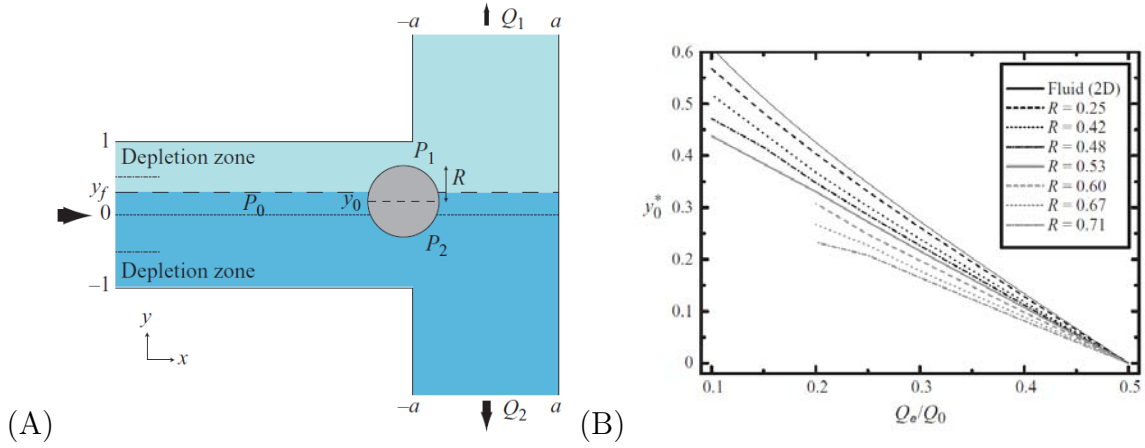


FIGURE 5.1.3: **Résultats numériques de Doyeux et al. (2011).** (A) Schéma de la bifurcation pour $Q_1 < Q_2$. La ligne pointillée à la position y_f est la ligne séparatrice du fluide en absence de particules, y_0 est la position initiale de la particule. R représente la taille traditionnellement des particules (ratio entre le rayon de la particule et la demi-largeur du canal) (B) Position de la ligne séparatrice des particules y_0^* (adimensionné : entre 0, au niveau de l'axe de symétrie du canal et 1, au niveau de la paroi du canal adjacente à la branche 1) en fonction de la fraction de débit totale dans cette branche, pour différentes valeurs de R .

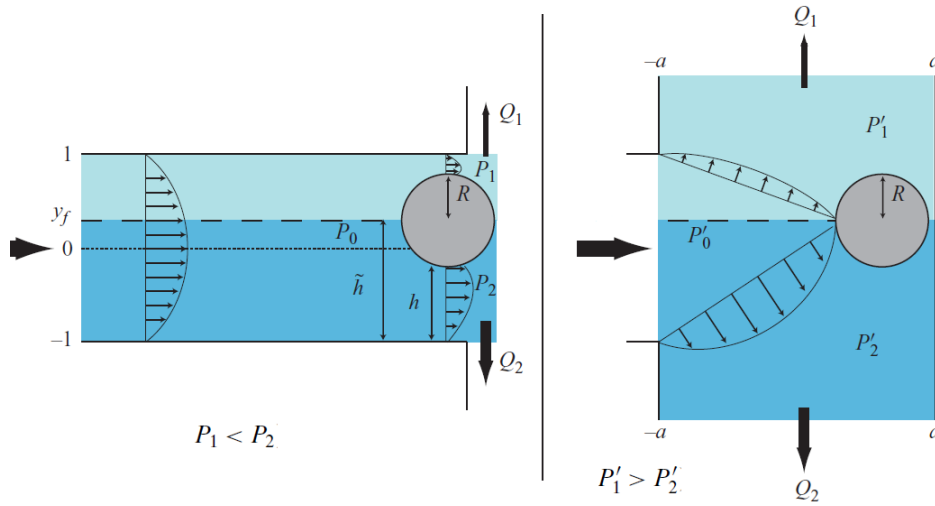


FIGURE 5.1.4: **Schématisation des deux effets apparaissant à la bifurcation**, pour la géométrie en forme de T considérée et $Q_1 < Q_2$, selon Doyeux et al. (2011). A gauche : attraction vers la branche de plus bas débit à l'entrée de la bifurcation, car la pression P_1 est inférieure à la pression P_2 . A droite : près du point de stagnation de la particule, la pression P'_1 est désormais supérieure à la pression P'_2 , et la particule est « attirée » vers la branche de plus grand débit.

microvasculaire.

La présence des globules rouges a un impact fort sur la dynamique des écoulements sanguins dans la microcirculation. Même s'il impacte peu la répartition des pressions dans un réseau microvasculaire (Guibert et al., 2010), l'effet de séparation de phase a des conséquences sur la répartition des hématocrites et des vitesses locales dans un réseau microvasculaire. Pozrikidis (2009) a en effet montré qu'à l'échelle du réseau la probabilité qu'un globule rouge entre dans une branche ou l'autre d'une bifurcation peut sensiblement affecter l'écoulement des globules rouges à l'échelle du réseau. En effet, lorsqu'au niveau d'une bifurcation un globule rouge entre dans un petit vaisseau, la viscosité effective dans ce vaisseau augmente, le débit diminue et les globules rouges suivant vont alors préférentiellement dans l'autre branche. Le déplacement des globules rouges se fait ainsi sentir à longue portée dans tout le réseau. Par ailleurs, lorsqu'une branche fille n'est pas suffisamment longue pour retrouver un écoulement symétrique, c'est un profil d'hématocrite non symétrique qui alimente la prochaine bifurcation, ce qui affecte donc la répartition des globules rouges et du plasma à la bifurcation et peut alors amplifier l'effet de séparation de phase.

A partir du principe de l'effet de séparation de phase, Yang et al. (2006) ont réalisé un dispositif expérimental associant des bifurcations successives pour séparer les globules rouges du plasma. Ils utilisent le fait qu'il existe une valeur critique de F_{tot} pour laquelle aucun globule rouge n'entre dans une des branches de la bifurcation. Roberts and Olbricht (2003) ont également eu l'idée d'exploiter les changements de distribution radiale de particules en plaçant des bifurcations en série, pour séparer des particules d'un fluide visqueux.

5.1.4 Conclusion et objectifs dans l'étude de l'effet de séparation de phase

Les études théoriques et numériques de l'effet de séparation de phase sont limitées par la complexité de l'écoulement qui est tridimensionnel. Les modèles développés à ce jour donnent toutefois des informations importantes sur l'hydrodynamique de particules à la bifurcation (Doyeux et al., 2011). D'un point de vue expérimental, les études *in vitro* avec des particules sphériques sont également limitées par la difficulté à reproduire le comportement des globules rouges. Par ailleurs, l'interprétation des études *in vivo* et *in vitro* avec des suspensions de globules rouges est parfois discutable, en effet, il est difficile de ne faire varier qu'un paramètre à la fois, de plus, la précision et la robustesse des métrologies associées restent parfois à démontrer (cf. mesures de vitesses par *dual-slit*, section 3.1 et précision des mesures photométriques Cokelet et al., 1998 et section 4.1.4).

Au vu de ces contraintes, l'effet de séparation de phase reste un problème ouvert. La relation empirique de Pries et al. (1989) déterminée *in vivo*, dans des conditions expérimentales difficiles, montre ses limites. Les efforts pour caractériser l'effet de séparation de phase restent donc d'actualité. Par exemple, Leble et al. (2011) ont analysé récem-

ment les profils de vitesse de globules rouges au niveau de micro bifurcations *in vitro*, mais de taille supérieure à 50 μm .

Notre but est d'étudier l'effet de séparation de phase pour des canaux de tailles inférieures à 20 μm . Pour des canaux de 5 à 25 μm , l'effet de séparation de phase est important. Les écoulements pour ces dimensions sont difficiles à modéliser numériquement, notamment à cause de la taille des globules rouges qui est proche de la taille du canal. Grâce aux progrès récents dans le domaine de la microfluidique, ces tailles de canaux sont désormais faciles à fabriquer. Nous nous intéressons à des gammes d'hématocrites intermédiaires, car un régime très dilué est loin des conditions physiologiques rencontrées *in vivo*, et en régime concentré il n'y a plus d'effet de séparation de phase. Notre approche pour comprendre et évaluer l'effet de séparation de phase a donc été d'utiliser des micro-bifurcations en PDMS et des suspensions de globules rouges. Le but est de contrôler certains paramètres de l'écoulement et d'en mesurer d'autres de façon rigoureuse et précise (taille des canaux, hématocrite, vitesses, débits). Dans la suite de ce chapitre, nous présentons tout d'abord le protocole expérimental mis en œuvre et les gammes de paramètres étudiées dans notre étude paramétrique de l'effet de séparation. Puis, nous décrivons les résultats obtenus *in vitro*, que nous comparons aux études antérieures *in vivo* (Pries et al., 1989) ou numériques (Doyeux et al., 2011).

5.2 Méthode d'étude

Nous présentons dans cette section comment a été menée l'étude paramétrique *in vitro* de l'effet de séparation de phase. Nous décrivons les gammes de paramètres entrant en jeux et la façon dont nous présentons les résultats dans la section suivante.

Les paramètres que nous faisons varier dans notre étude *in vitro* de l'effet de séparation de phase sont :

- la taille des micro-canaux (4 types de micro-bifurcations),
- l'hématocrite de tube en entrée, de dilué (<2%) à concentré ($\sim 20\%$),
- le débit en entrée, qui dépend du gradient de pression imposé : de $Q_{tot}^e = 7.10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$ à $Q_{tot}^e = 8,5.10^5 \mu\text{m}^3/\text{s}$, correspondant à une vitesse des globules rouges au centre du canal de $V_0 = 29 \mu\text{m}/\text{s}$ et $V_0 = 3900 \mu\text{m}/\text{s}$,
- la dissymétrie des débits en sortie, qui dépend également du gradient de pression imposé : de $Q_{tot}^1/Q_{tot}^2 = 0$ à $Q_{tot}^1/Q_{tot}^2 = 1$, avec $Q_{tot}^2 < Q_{tot}^1$.

Lors des expériences, nous procédons toujours de la même façon. Pour chaque type de micro-bifurcation, nous avons autant que possible exploré différentes gammes d'hématocrite : au moins un cas dilué ($\sim 5\%$), un cas intermédiaire ($\sim 10\%$) et un cas concentré ($\geq 15\%$). Pour un gradient de pression imposé en entrée, à partir de gradients de pression symétriques en sortie, nous faisons varier une des pression en sortie jusqu'à arriver à un écoulement nul dans une des branches filles. Nous essayons d'avoir au moins deux gammes de débits en entrée, petit débit ($< 10^5 \mu\text{m}^3/\text{s}$) et grand débit ($> 3.10^5 \mu\text{m}^3/\text{s}$), pour chaque type de bifurcation. Les débits sont évalués à partir de la vitesse des glo-

bules rouges. Pour chaque cas d'écoulement (une bifurcation, un hématochte d'entrée, un débit d'entrée, un rapport des débit en sortie), nous enregistrons une séquence d'images.

Avec les contraintes expérimentales, il n'est toujours possible d'explorer toutes les gammes d'écoulement souhaitées, d'un enregistrement à l'autre, l'écoulement peut être bloqué par une poussière ou des globules rouges. De plus, il est très difficile de garder un hématochte constant dans le micro-canal tout au long d'une même expérience, et donc il n'est pas toujours possible d'explorer toutes les gammes d'hématochte souhaitées. Quoiqu'il en soit, nous avons pu enregistrer :

- 7 cas d'écoulements dans la géométrie 10 μ m-10 μ m-10 μ m,
- 13 cas d'écoulements dans la géométrie 10 μ m-20 μ m-10 μ m,
- 8 cas d'écoulements dans la géométrie 10 μ m-20 μ m-20 μ m,
- 17 cas d'écoulements dans la géométrie 20 μ m-20 μ m-20 μ m.

Les résultats décrits dans la section suivante, sont classiquement présentés en termes de F_{GR} en fonction de F_{tot} . Lorsque la bifurcation est symétrique, la courbe passe par le point (0,5 ; 0,5), les données sont dans ces cas symétrisées de façon à ce que, pour les deux branches filles, F_{tot} et F_{GR} soient compris entre 0 et 0,5. Autrement dit, lorsque $F_{tot} > 0,5$ nous représentons les valeurs $1 - F_{tot}$ et $1 - F_{GR}$. Les barres d'erreurs ont été calculées pour chaque valeur de F_{GR} , la valeur de l'incertitude totale prend en compte les incertitudes sur :

- les mesures de *dual-slit*,
- le calcul de la surface de la section du canal, et donc l'incertitude sur la mesure de la largeur du canal,
- la mesure d'hématochte.

Le calcul des incertitudes est détaillé en Annexe C. Les incertitudes sur F_{tot} ne sont pas représentées car elles sont difficiles à évaluer compte tenu des hypothèses faites pour évaluer le débit de fluide suspendant (cf. section 3.3.2).

Pour les bifurcations 10 μ m-20 μ m-10 μ m, nous avons corrigé la valeur du débit de globules rouges en entrée, de sorte que $\tilde{Q}_{GR}^e = Q_{GR}^1 + Q_{GR}^2$ (cf. section 4.1.1). Pour les autres types de bifurcations, nous avons décidé de ne garder que les cas où la conservation des débits de globules rouges est acceptable, c'est-à-dire quand le rapport $\frac{Q_{GR}^1 + Q_{GR}^2}{Q_{GR}^e}$ est compris entre 0,9 et 1,1. Ainsi, au final, les résultats présentés dans ce qui suit concernent :

- 3 cas d'écoulements dans la géométrie 10 μ m-10 μ m-10 μ m,
- 13 cas d'écoulements dans la géométrie 10 μ m-20 μ m-10 μ m,
- 5 cas d'écoulements dans la géométrie 10 μ m-20 μ m-20 μ m,
- 13 cas d'écoulements dans la géométrie 20 μ m-20 μ m-20 μ m.

5.3 Étude paramétrique *in vitro* : résultats

Dans cette section, nous présentons d'abord les résultats obtenus en termes de débit fractionnaires de globules rouges en fonction du débit fractionnaire de sang total pour chaque type de bifurcation. Ces données sont comparées au modèle empirique obtenu *in vivo* de Pries et al. (1989), puis aux résultats numériques de Doyeux et al. (2011).

5.3.1 Mise en évidence de l'effet de séparation de phase

Les figures 5.3.1 et 5.3.2 présentent les résultats obtenus dans les bifurcations symétriques $20\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-10\mu\text{m}$, pour lesquelles nous avons le plus de points expérimentaux. Nous utilisons des marqueurs différents selon le type de méthode appliquée pour mesurer l'hématocrite. Cela donne ainsi également une idée de la gamme d'hématocrite des points de mesures considérés. Les mesures d'hématocrite par comptage correspondent à des cas d'écoulement dilués ($H_t < 8\%$) et les mesures photométriques ou par déduction à des cas plus concentrés ($H_t > 8\%$). Sur la figure 5.3.1, les points expérimentaux pour lesquels l'hématocrite a été mesuré par photométrie (en bleu clair) semblent moins éloignés de la droite identité, que les points pour lesquels l'hématocrite a été déterminé par comptage (bleu foncé). Un effet de séparation de phase est visible, qui semble donc plus marqué lorsque l'hématocrite est petit. Sur la figure 5.3.2, pour de plus petites tailles de canaux des branches filles, les points sont bien en dessous de la droite identité. Ceci est en accord avec le fait que l'effet de séparation de phase est d'autant plus marqué que la taille des canaux est petite.

La figure 5.3.3 présente les résultats, toujours dans un cas de bifurcation symétrique, avec trois canaux de taille $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. Nous avons peu de points expérimentaux dans ce cas, pour lequel il est difficile de conclure sur un effet de séparation de phase.

La figure 5.3.4 montre les résultats obtenus pour la bifurcation dissymétrique $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$. Par manque de données expérimentales il est ici aussi difficile de conclure sur un effet de séparation de phase. Toutefois l'effet de seuil, déjà décrit par Pries et al. (1989), est clairement visible pour cette géométrie de bifurcation.

5.3.2 Comparaison des résultats expérimentaux au modèle empirique de Pries et al. (1989)

Sur les figures 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3 et 5.3.4, présentées ci-dessus, nous avons ajouté les courbes obtenues par le modèle empirique de Pries et al. (1989) pour des globules rouges de rat (courbes grises) et d'Homme (courbes rouges), pour la géométrie correspondante, et pour trois hématocrites de débit dans la branches d'entrée (5, 10 et 20 %), correspondant à notre gamme expérimentale. Plus H_D^e est élevé plus ces courbes se rapprochent de la droite identité. Toutefois, dans la description empirique de Pries et al. (1989), l'influence de l'hématocrite de débit est assez peu marquée dans les gammes considérées. Il

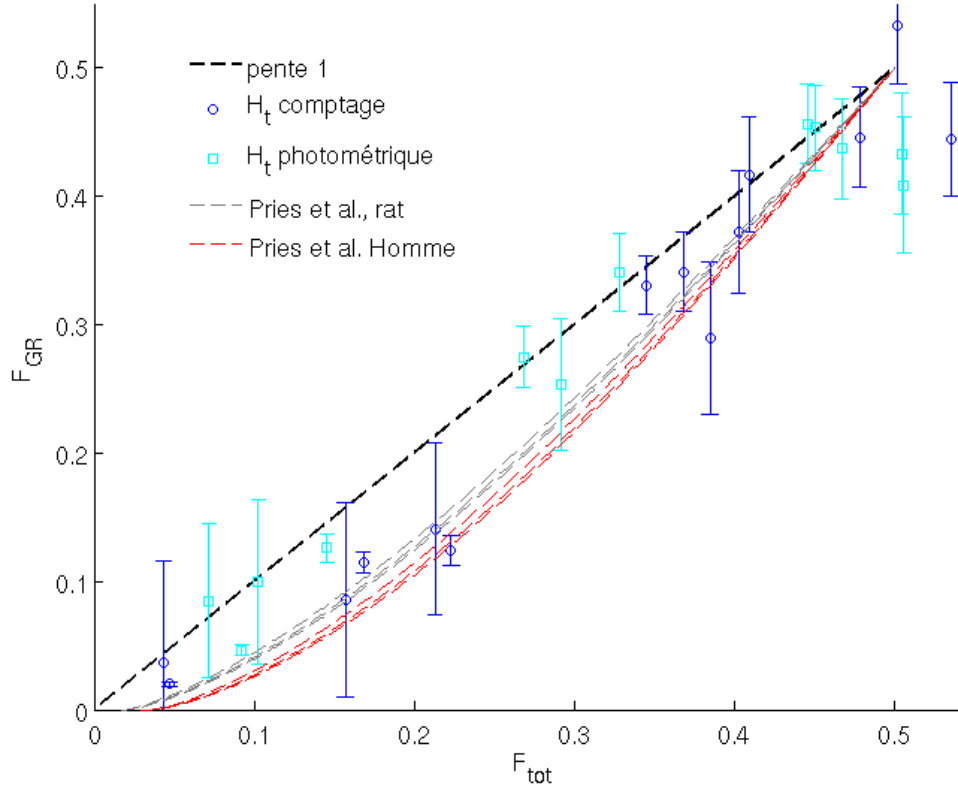


FIGURE 5.3.1: F_{GR} en fonction de F_{tot} pour les bifurcations 20 μ m-20 μ m-20 μ m. Les cercles bleu foncé correspondent aux cas où l'hématocrite a été évalué par comptage dans les trois branches (avec $H_t < 8\%$), les carrés bleu clair sont les cas où l'hématocrite a été déterminé par la méthode photométrique dans au moins deux des branches de la bifurcation (avec $H_t > 8\%$). Les courbes pointillées représentent la fonction empirique de Pries et al. (1989), pour des globules rouges de rat (gris) et d'Homme (rouge), pour 3 valeurs de H_D^c : 20%, 10% et 5% (en s'éloignant de la droite identité). Les données provenant des deux branches filles d'une bifurcation ont été symétrisées, de sorte que $0 \leq F_{tot} \leq 0,5$. Par ailleurs, les barres d'erreurs ont été calculées en prenant en compte la valeur de F_{GR} non symétrisée, ce qui explique les hétérogénéités des barres d'erreur (l'erreur représentée est d'autant plus grande que la valeur de F_{GR} non symétrisé est grande).

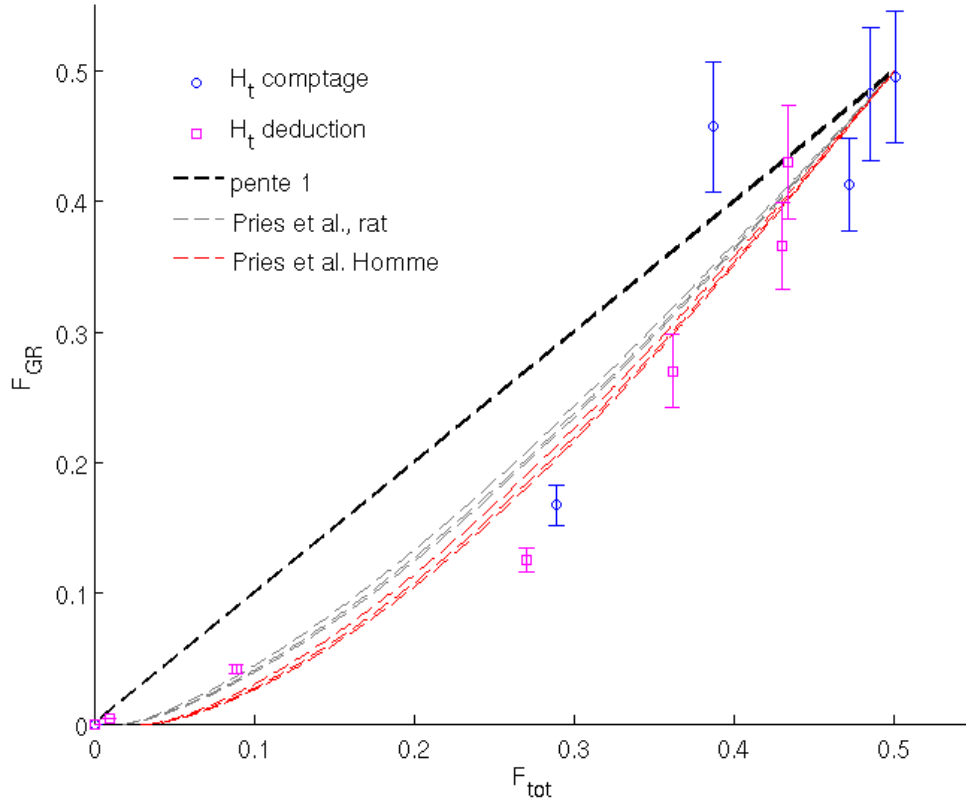


FIGURE 5.3.2: F_{GR} en fonction de F_{tot} pour les bifurcations $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-10\mu\text{m}$. Les marqueurs cercles bleus correspondent aux cas où l'hématocrite a été évalué par comptage dans les trois branches (avec $H_t \leq 8\%$), les carrés magenta correspondent aux cas où l'hématocrite a été évalué par déduction dans la branche d'entrée, et par comptage dans les branches filles (avec $H_t^e > 8\%$). Les courbes pointillées représentent la fonction empirique de Pries et al. (1989), pour des globules rouges de rat (gris) et d'Homme (rouge), pour 3 valeurs de H_D^e : 20%, 10% et 5% (en s'éloignant de la droite identité).

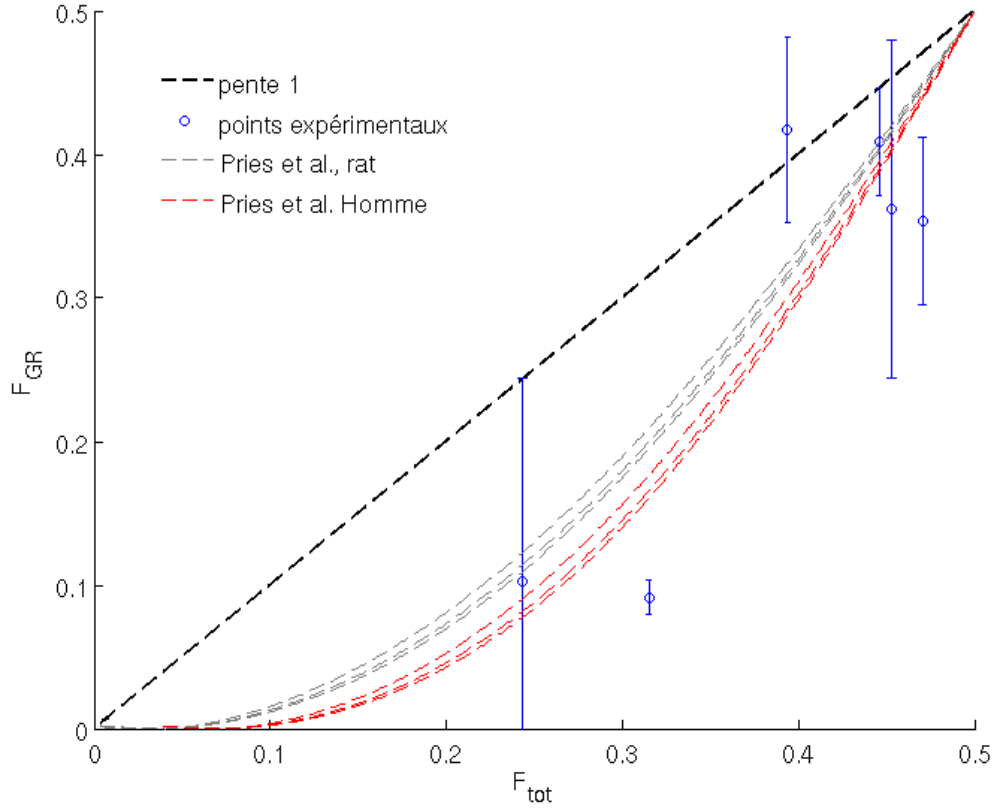


FIGURE 5.3.3: F_{GR} en fonction de F_{tot} pour les bifurcations $10\mu\text{m}-10\mu\text{m}-10\mu\text{m}$. Les courbes pointillées représentent la fonction empirique de Pries et al. (1989), pour des globules rouges de rat (gris) et d'Homme (rouge), pour 3 valeurs de H_D^e : 20%, 10% et 5% (en s'éloignant de la droite identité).

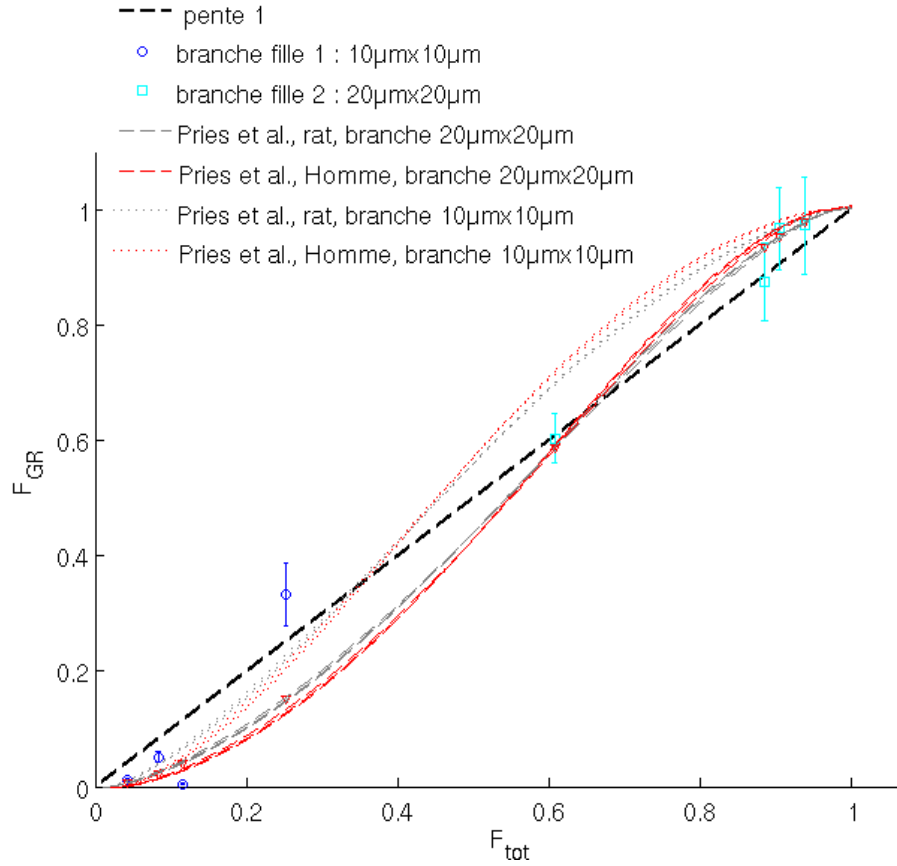


FIGURE 5.3.4: F_{GR} en fonction de F_{tot} pour les bifurcations $10\mu m$ - $20\mu m$ - $20\mu m$. Les cercles bleu foncé correspondent aux mesures de débit dans la branche de section $10\mu m \times 10\mu m$ et les carrés bleu clair aux mesures dans la branche de section $20\mu m \times 20\mu m$. Les courbes pointillées représentent la fonction empirique de Pries et al. (1989), pour des globules rouges de rat (gris) et d'Homme (rouge), pour 3 valeurs de H_D^e : 20%, 10% et 5% (en s'éloignant de la droite identité).

faut atteindre des gammes d'hématocrite de débit très différentes ($<20\%$ et $>80\%$ par exemple pour une bifurcation $20\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$) pour observer une réelle influence de l'hématocrite de débit sur la forme de la courbe sigmoïde.

Pour la géométrie $20\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$ nous avons une influence de l'hématocrite qui est plus marquée que celle prédite par la description de Pries et al. (1989), alors que pour la géométrie $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-10\mu\text{m}$ l'influence de l'hématocrite est beaucoup moins marquée. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence de régime d'écoulement entre les canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ (cf. section 4.2.2), différence qui n'est pas prise en compte par Pries et al. (1989).

Nous comparons ensuite nos valeurs expérimentales de F_{GR} à la valeur prédite par le modèle de Pries et al. (1989), appliqué à l'Homme. Les résultats sont présentés en figure 5.3.5. La figure 5.3.5 (A) semble montrer que l'effet de séparation de phase est sur-évalué par le modèle de Pries et al. (1989) pour une bifurcation symétrique avec trois canaux de taille $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$. Pour la bifurcation symétrique $10\mu\text{m}-20\mu\text{m}-10\mu\text{m}$, c'est la tendance contraire qui semble se vérifier, figure 5.3.2. Ces différences observées selon la géométrie de la bifurcation pourraient être liées aux différences de régime d'écoulement entre les canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$. Toutefois, des mesures supplémentaires sont nécessaires pour approfondir ces résultats.

5.3.3 Comparaison des résultats expérimentaux au modèle numérique de Doyeux et al. (2011)

Les points expérimentaux pour la bifurcation $20\mu\text{m}-20\mu\text{m}-20\mu\text{m}$ (présentés en figure 5.3.1) sont superposés à la courbe de Doyeux et al. (2011) obtenus numériquement en 2D, voir figure 5.3.6. Ces données numériques représentent la fraction de particules qui entre dans une branche fille en fonction de la fraction de débit total qui entre dans cette même branche, pour des particules circulaires, pour une bifurcation où les trois branches ont la même taille et pour un rapport entre le diamètre des particules et la largeur du canal de 0,42. *In vitro*, nous avons un rapport entre la taille des globules rouges et des canaux d'environ 0,4 pour ce type de bifurcation. Pour des suspensions diluées de globules rouges (marqueurs bleus foncés), les points expérimentaux sont assez proches de la courbe numérique obtenus pour des particules isolées. Pour des suspensions de globules rouges plus concentrées (marqueurs bleus clair), l'effet de séparation de phase diminue significativement.

Par ailleurs, grâce à la base de données de séquences d'images dont nous disposons, il serait intéressant d'analyser les trajectoires des globules rouges au niveau de la bifurcation pour les comparer aux prédictions de Doyeux et al. (2011) concernant la position des lignes séparatrices du fluide et des globules rouges.

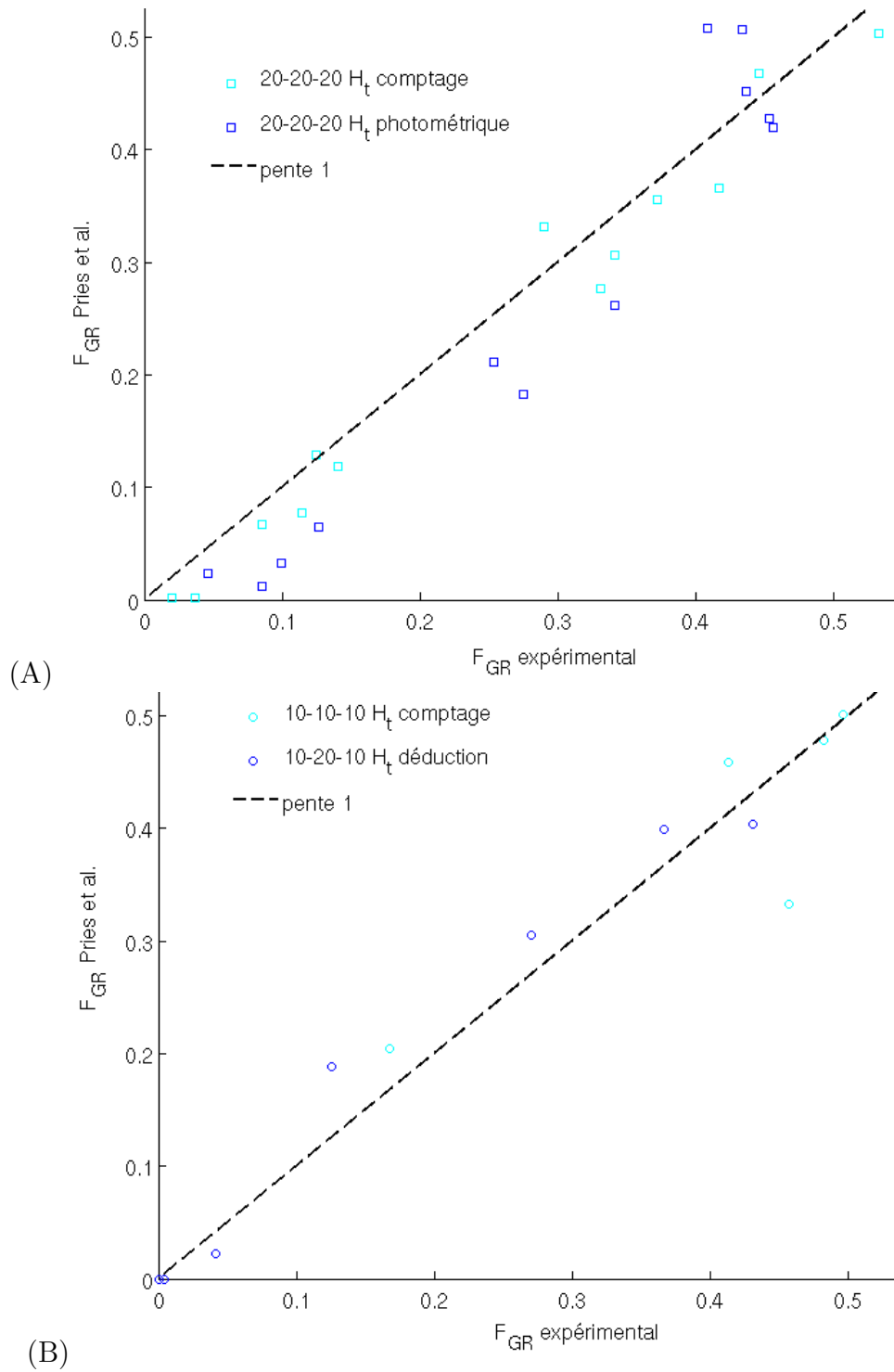


FIGURE 5.3.5: Débit fractionnaire de globules rouges déterminé par la relation empirique de Pries et al. (1989) appliquée à l'Homme en fonction du débit fractionnaire de globules rouges déterminé *in vitro*. (A) Géométrie 20µm-20µm-20µm. (B) Géométrie 10µm-20µm-10µm.

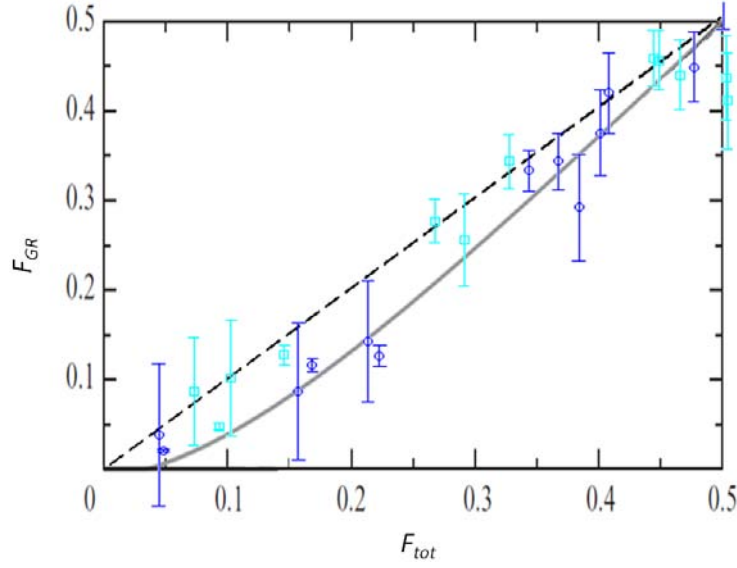


FIGURE 5.3.6: **Superposition des données obtenues *in vitro* dans les bifurcations 20 μ m-20 μ m-20 μ m et des données de Doyeux et al. (2011) obtenues numériquement.** Les carrés bleus clairs correspondent aux grands hématocrites ($H_t > 8\%$), les carrés bleus foncés aux petits hématocrites ($H_t < 8\%$), la droite pointillée est la droite identité et la courbe grise représente le modèle numérique de Doyeux et al. (2011).

5.4 Conclusion et perspectives

Les expériences réalisées *in vitro* montrent que nous avons un protocole expérimental opérationnel pour caractériser l'effet de séparation de phase. Par ailleurs, l'analyse des résultats permet de dégager de grandes tendances : l'influence de l'hématocrite sur l'effet de séparation de phase, très marquée pour la géométrie de bifurcation 20 μ m-20 μ m-20 μ m, semble supérieure à l'influence prédite par Pries et al. (1989) pour des vaisseaux de même diamètre. L'effet de séparation de phase semble plus marqué pour la géométrie 10 μ m-20 μ m-10 μ m que ce qui est prédit par l'approche empirique de Pries et al. (1989) pour des vaisseaux de même diamètre. Toutefois, il apparaît clairement que des expériences supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir quantifier l'effet de séparation de phase avec plus de certitude. Nous disposons tout de même d'une base de données expérimentale conséquente de séquences d'images de l'écoulement de globules rouges aux niveau de micro-bifurcations, qui pourrait nous permettre d'étudier les mécanismes qui entrent en jeu à la bifurcation. En particulier, l'évaluation de la longueur de relaxation telle, qu'après la bifurcation, la distribution spatiale des globules rouges redevienne symétrique dans la largeur du canal, serait intéressante. Ceci permettrait de mieux prédire ce qui se passe dans un réseau comportant des bifurcations successives.

Une perspective de ce travail consiste donc à reprendre les expériences pour avoir plus de points de données, notamment pour les bifurcations 10 μ m-10 μ m-10 μ m et 10 μ m-

20 μ m-20 μ m. Il serait ensuite intéressant d'étudier s'il y a un effet de l'agrégation et/ou de la rigidification des globules rouges. Sur ce point, il faut d'ailleurs noter que les résultats expérimentaux de Pries et al. (1989), auxquels nous confrontons nos données, ont justement été obtenus dans des conditions expérimentales différentes des nôtres (agrégation des globules rouges possible et vaisseaux cylindriques)

5.5 Bibliographie

- Barber, J., J. Alberding, J. Restrepo, and T. Secomb (2008). Simulated two-dimensional red blood cell motion, deformation, and partitioning in microvessel bifurcations. *Ann Biomed Eng* 36, 1690–1698.
- Carr, R. T. and L. L. Wickham (1991, March). Influence of vessel diameter on red-cell distribution at microvascular bifurcations. *Microvascular Research* 41(2), 184–196.
- Chien, S., C. Tvetenstrand, M. Epstein, and G. Schmidtschonbein (1985). Model studies on distribution of blood-cells at microvascular bifurcations. *American Journal of Physiology* 248, 568–576.
- Cokelet, G., A. Pries, and M. Kiani (1998). Observations on the accuracy of photometric techniques used to measure some in vivo microvascular blood flow parameters. *Microcirculation - London* 5(1), 61–70.
- Dellimore, J., M. Dunlop, and P. Canham (1983). Ratio of cells and plasma in blood flowing past branches in small plastic channels. *American Journal of Physiology* 244(5), 635–643.
- Ditchfield, R. and W. Olbricht (1996). Effects of particle concentration on the partitioning of suspensions at small divergent bifurcations. *J. Biomech. Eng. Trans. Asme* 118(3), 287–294.
- Doyeux, V., T. Podgorski, S. Peponas, M. Ismail, and G. Coupier (2011). Spheres in the vicinity of a bifurcation : elucidating the zweifach-fung effect. *Journal of Fluid Mechanics* 674, 359–388.
- Duling, B. and D. Dam (1987). An examination of the measurement of flow heterogeneity in striated-muscle. *Circ. Res.* 60(1), 1–13.
- El-Kareh, A. W. and T. W. Secomb (2000). A model for red blood cell motion in bifurcating microvessels. *Int. J. Multiphase Flow* 26(9), 1545 – 1564.
- Enden, G. and A. Popel (1994). A numerical study of plasma skimming in small vascular bifurcations. *J. Biomech. Eng. Trans. Asme* 116(1), 79–88.

- Fenton, B. M., R. T. Carr, and G. R. Cokelet (1985). nonuniform red-cell distribution in 20 to 100 μm bifurcations. *Microvascular Research* 29(1), 103–126.
- Guibert, R., C. Fonta, and F. Plouraboue (2010, May). A new approach to model confined suspensions flows in complex networks : application to blood flow. *Transport In Porous Media* 83(1), 171–194.
- Hyakutake, T., T. Matsumoto, and S. Yanase (2006). Lattice boltzmann simulation of blood cell behavior at microvascular bifurcations. *Mathematics and Computers in Simulation* 72(2-6), 134 – 140.
- Johnson, P. C. (1971). Red cell separation in the mesenteric capillary network. *American Journal of Physiology* 221(1), 99–104.
- Klitzman, B. and B. Duling (1979). Micro-vascular hematocrit and red-cell flow in resting and contracting striated-muscle. *American Journal of Physiology* 237(4), 481–490.
- Klitzman, B. and P. Johnson (1982). Capillary network geometry and red-cell distribution in hamster cremaster muscle. *American Journal of Physiology* 242(2), 211–219.
- Krogh, A. (1922). *Anatomy and Physiology of Capillaries*. New Haven, Yale Univ. Press.
- Leble, V., R. Lima, R. Dias, C. Fernandes, T. Ishikawa, Y. Imai, and T. Yamaguchi (2011). Asymmetry of red blood cell motions in a microchannel with a diverging and converging bifurcation. *Biomicrofluidics* 5(4), 044120.
- Ley, K., L. Linbom, and K. Arfors (1988). Hematocrit distribution in rabbit tenuissimus muscle. *Acta Physiologica scandinavica* 132(3), 373–383.
- Lorthois, S., F. Cassot, and F. Lauwers (2011). Simulation study of brain blood flow regulation by intra-cortical arterioles in an anatomically accurate large human vascular network : Part i : Methodology and baseline flow. *Neuroimage* 54(2), 1031–1042.
- Perkkio, J. and R. Keskinen (1983). Hematocrit reduction in bifurcations due to plasma skimming. *Bulletin of Mathematical Biology* 45, 41–50.
- Pozrikidis, C. (2009). Numerical simulation of blood flow through microvascular capillary networks. *Bulletin of Mathematical Biology* 71, 1520–1541.
- Pries, A., T. Secomb, P. Gaehtgens, and J. Gross (1990). Blood-flow in microvascular networks - experiments and simulation. *Circulation research* 67(4), 826–834.
- Pries, A. R., K. Ley, M. Claassen, and P. Gaehtgens (1989). Red cell distribution at microvascular bifurcations. *Microvasc Res* 38(1), 81 – 101.
- Roberts, B. and W. Olbricht (2006). The distribution of freely suspended particles at microfluidic bifurcations. *Aiche Journal* 52(1), 199–206.

- Roberts, B. W. and W. L. Olbricht (2003). Flow-induced particulate separations. *Aiche Journal* 49, 2842–2849.
- Yang, S., A. Undar, and J. D. Zahn (2006). A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation. *Lab On A Chip* 6(7), 871–880.

Conclusion et perspectives

Le sang est une suspension concentrée de globules rouges, des cellules déformables qui assurent le transport des gaz respiratoires. Dans la microcirculation, la taille des vaisseaux sanguins est comparable à la taille d'un globule rouge. En conséquence, les effets dynamiques liés à la présence de ces cellules jouent un rôle important dans le transport de matière et les échanges avec les tissus. En particulier, l'effet de séparation de phase, c'est-à-dire la répartition non proportionnelle des globules rouges et du plasma aux bifurcations microvasculaires, contribue à rendre la fraction volumique des globules rouges et leur vitesse très hétérogènes d'un vaisseau à l'autre d'un réseau microvasculaire. Même si la grande hétérogénéité de l'hémodynamique microvasculaire est bien démontrée, les mécanismes de répartition des globules rouges et du plasma aux bifurcations restent à clarifier.

Ce travail de thèse s'est inscrit dans une volonté de comprendre et de quantifier l'effet de séparation de phase aux micro-bifurcations. Les récentes avancées dans le domaine de la microfluidique ont montré son fort potentiel pour étudier des écoulements dans des vaisseaux de la taille de capillaires sanguins ($< 20\mu\text{m}$). L'objectif de ce travail a donc été d'étudier finement l'effet de séparation de phase *in vitro*, dans un régime représentatif des conditions physiologiques, rarement étudié en conditions d'écoulement contrôlé. Dans ce but, un dispositif expérimental microfluidique a tout d'abord été mis en place. Les aspects métrologiques spécifiques aux suspensions concentrées de globules rouges ont été examinés, afin de quantifier les paramètres de l'écoulement. Puis, différents régimes d'écoulements dans des micro-canaux uniques droits ont été explorés, en faisant varier le débit, l'hématocrite, et la taille de la section droite de ces micro-canaux. Finalement, l'effet de séparation de phase à l'aide de micro-bifurcations divergentes de différentes tailles, pour différents débits et concentrations des globules rouges a été étudié. Dans la suite, nous revenons sur chacun de ces points, en faisant ressortir les perspectives associées.

La première étape de ce travail de thèse a été la mise en place d'un dispositif expérimental microfluidique permettant l'étude des écoulements sanguins en micro-canaux. Ce travail a compris la fabrication de différents moules par photolithographie et leur utilisation pour réaliser des microsystèmes en PDMS, dans lesquels l'écoulement de suspensions de globules rouges est généré et visualisé. L'ensemble du dispositif expérimental nous a permis d'obtenir des séquences d'images d'écoulements de globules rouges à analyser.

Le deuxième point abordé a été la quantification des paramètres de l'écoulement. Ces paramètres sont le champ des vitesses et le champ des concentrations qui permettent ensuite de déduire les débits de globules rouges et de fluide suspendant. Pour mesurer des vitesses de globules rouges dans des microvaisseaux, en conditions physiologiques d'écoulement, et donc pour des hématokrites pouvant être assez élevés, l'analyse de la littérature a montré que la *dual-slit*, une technique de corrélation temporelle, avait le meilleur potentiel. Toutefois, la problématique des gradients de vitesse à l'échelle de la mesure n'était pas résolue, et la signification physique de la vitesse mesurée par cette technique restait à démontrer. Nous nous sommes donc particulièrement concentrés sur l'étude de cette technique et sur l'effet des gradients de vitesse sur la mesure. La *dual-slit* a ainsi été validée et optimisée. Nous avons montré que cette technique permet de mesurer la vitesse maximale des globules rouges dans la profondeur du canal, et amène à un profil de vitesse maximale des globules rouges dans la direction transversale d'un micro-canal avec une très bonne résolution spatiale.

Concernant les mesures d'hématocrite, une méthode de comptage des globules rouges a été utilisée, quelque soit la taille du micro-canal, à condition que l'hématocrite ne soit pas trop élevé, typiquement 8% dans un canal de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ et 13% dans un canal de section $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$. Nous avons également développé une méthode d'évaluation de l'hématocrite à partir de mesures de densité optique. Cette méthode photométrique est adaptée aux canaux de section $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ pour des hématokrites pouvant aller jusqu'à 18%. Notons que des améliorations peuvent être apportées concernant la mesure d'hématocrite par comptage, il serait intéressant d'automatiser le comptage grâce à des techniques de traitement d'images, afin d'individualiser les globules rouges qui montrent des orientations et des formes très différentes dans un micro-canal, et qui peuvent se chevaucher. Une telle technique apporterait un gain de temps sur le traitement des données et permettrait de mesurer l'hématocrite sur un plus grand nombre d'images pour obtenir une moyenne statistique plus juste.

A partir des mesures de profils de vitesse maximale par *dual-slit* et d'hématocrite nous évaluons ensuite le débit de globules rouges. Cette méthode de mesure a été validée par comparaison à une méthode de référence, la mesure du débit de globules rouges par comptage. Nous déterminons également le débit de fluide suspendant à partir des mesures de *dual-slit*, en faisant l'hypothèse d'un profil newtonien de vitesse maximale égale à celle des globules rouges et sans glissement aux parois.

La suite de ce travail a été d'appliquer les métrologies développées pour différents régimes d'écoulements de globules rouges en micro-canaux. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'application du principe de conservation de la masse aux globules rouges, au fluide suspendant et au sang total qui arrivent au niveau d'une micro-bifurcation divergente. Pour cela, nous avons comparé le débit de globules rouges, de fluide suspendant, ou total, mesuré dans la branche d'entrée, à la somme des débits mesurés dans les branches filles. Les résultats obtenus valident les méthodes de mesure des écoulements de globules rouges en micro-canaux. De plus, ils mettent en évidence que, dans la limite

des incertitudes de mesure, les hypothèses effectuées sur le profil de vitesse du fluide suspendant, déduit simplement à partir de la vitesse maximale des globules rouges, sont valides.

Nous avons ensuite analysé les profils de vitesse de globules rouges obtenus grâce à la technique de *dual-slit* dans des micro-canaux de différentes tailles, pour de larges gammes d'hématocrites et de vitesses. Les profils de vitesse présentés montrent la capacité de la technique de *dual-slit* à fournir des profils précis de vitesse maximale. Les formes des profils de vitesse des globules rouges reportées sont similaires à celles décrites auparavant *in vitro* ou *in vivo* pour des suspensions de globules rouges. De plus, la technique de *dual-slit* permet de mesurer une vitesse non nulle de glissement des globules rouges au niveau des parois des micro-canaux, qui, dans les travaux antérieurs, était généralement inconnue et supposée égale à zéro. Nous avons mis en évidence que cette vitesse de glissement des globules rouges aux parois est d'autant plus petite que la suspension est concentrée. Par ailleurs, deux régimes d'écoulement des globules rouges ont été observés, qui dépendent de la taille du micro-canal. Ainsi, lorsque la taille du canal est proche de la taille d'un globule rouge (section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$), les globules rouges circulent tous à la même vitesse et le profil de vitesse est plat. Lorsque le micro-canal est un peu plus grand (section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$), l'écoulement présente des gradients de vitesse, avec un profil de vitesse des globules rouges aplati.

Le dernier point abordé a été l'étude paramétrique *in vitro* de l'effet de séparation de phase au niveau de micro-bifurcations divergentes. Les études théoriques et numériques de l'effet de séparation de phase sont limitées par la complexité de l'écoulement des globules rouges, et par le fait que cet effet apparaît lorsque la taille des particules devient proche de la taille des canaux. Par ailleurs, l'interprétation des études précédemment menées *in vivo* et *in vitro* est parfois discutable, au vu des conditions expérimentales et des métrologies associées qui n'ont pas toujours été validées. C'est pourquoi nous avons choisi une étude *in vitro* de l'effet de séparation de phase, à l'aide de micro-bifurcations en PDMS composées de canaux de section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ et $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$, et de suspensions de globules rouges d'hématocrite intermédiaire (autour de 10%). Il s'agit de tailles de canaux et de gammes d'hématocrites pour lesquelles il a été démontré auparavant que l'effet de séparation est bien visible. L'originalité du travail a été de mesurer rigoureusement tous les paramètres de l'écoulement.

Nos résultats ont été comparés aux résultats obtenus par d'autres équipes *in vivo*, ainsi qu'à des simulations de références conduites avec des suspensions de particules circulaires, rigides et monodisperses. Nous retrouvons les mêmes tendances que celles décrites dans ces précédentes études : l'effet de séparation de phase est d'autant plus marqué que l'hématocrite est petit et que la taille des canaux est petite. Des régimes différents apparaissent selon la géométrie de la bifurcation. Ainsi pour une géométrie comportant trois canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$, nous observons une influence plus importante de l'hématocrite sur l'effet de séparation de phase que ce qui a pu être rapporté *in vivo*. Pour une géométrie de bifurcation comportant un canal d'entrée de section

$20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et deux canaux de sortie de section $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$, c'est l'effet de séparation de phase qui est plus marqué que celui prédit par une approche empirique *in vivo*, mais l'influence de l'hématocrite semble très peu importante. Les différences observées selon la géométrie de bifurcation pourraient être associées aux différences de régimes d'écoulement entre les canaux de section $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$. Toutefois, nous ne disposons pas d'assez de points de données expérimentaux pour quantifier cet effet avec certitude. Une perspective immédiate est donc la reprise des expériences, grâce au protocole expérimental opérationnel développé pour caractériser l'effet de séparation de phase. Par ailleurs, la base de données expérimentales dont nous disposons actuellement, nous permettrait de réaliser l'étude de la trajectoire des globules rouges à la bifurcation, ou encore d'évaluer la longueur de relaxation telle, qu'après la bifurcation, la distribution spatiale des globules rouges redevienne symétrique dans la largeur du canal. Il serait, par la suite, également intéressant de quantifier l'influence de l'agrégation ou de la rigidification des globules rouges sur l'effet de séparation de phase, à l'aide de modifications de la composition du fluide suspendant (ajout de fibrinogène ou de dextran, par exemple).

Glossaire

Artère : vaisseau qui amène le sang du cœur vers les tissus.

Artériole : petite artère.

Capillaire : les plus fins et plus petits vaisseaux sanguins qui conduisent le sang des artérioles aux veinules et constituent les sites des échanges de gaz, de cellules ou de liquide entre le sang et les tissus.

Cellules endothéliales : cellules qui constituent l'endothélium, la couche la plus interne de la paroi des vaisseaux sanguins, en contact avec le sang.

Cellules musculaires lisses : cellules contractiles situées dans la paroi de certains vaisseaux sanguins. Ces cellules permettent aux vaisseaux de se dilater ou de se contracter de façon active.

Exogène : extérieur à l'organisme.

Endogène : synthétisé par l'organisme lui-même.

Globules rouges : également appelés hématies ou érythrocytes, cellules sanguines dépourvues de noyau, dont l'intérieur est riche en hémoglobine et qui assurent le transport des gaz respiratoires.

Hématocrite : fraction volumique de globules rouges circulant dans le sang.

Hématocrite de tube : rapport entre le volume de globules rouges et le volume de sang total contenu dans un vaisseau.

Hématocrite de débit : rapport entre le débit de globules rouges et le débit de sang total qui alimente un vaisseau.

Hémodynamique : dynamique du sang, propriétés physiques de l'écoulement sanguin en mouvement dans le système cardiovasculaire.

Hémoglobine : protéine dont la principale fonction est le transport du dioxygène dans l'organisme. Elle se trouve essentiellement à l'intérieur des globules rouges.

Macrocirculation : sous-ensemble du système de circulation sanguine, dont la principale fonction est le transport du sang depuis et vers les tissus. Le diamètre des vaisseaux y est supérieur à 150µm.

Microcirculation : sous-ensemble du système de circulation sanguine où s'effectuent les échanges gazeux et liquidiens. Le diamètre des vaisseaux y est inférieur à 150µm.

Plasma : composant liquide du sang dans lequel les cellules sanguines sont en suspension.

Veine : vaisseau qui amène le sang des tissus vers le cœur.

Veinule : petite veine.

Viscosité apparente : pour un fluide circulant dans un vaisseau, c'est la viscosité du fluide newtonien circulant dans un tube de même diamètre, de même longueur, sous la même différence de pression, et avec le même débit.

Viscosité relative : viscosité apparente normalisée par la viscosité du plasma.

Annexes

Annexe A

Plans des micro-canaux

Nous donnons ici le détail de l'architecture des moules contenant les micro-canaux droits et les micro-bifurcations.

A.1 Micro-canaux uniques, droits

La figure A.1 présente l'architecture des micro-canaux utilisée pour réaliser le masque verre-chrome (a) et le détail d'un micro-canal (b). 4 masques sont réalisés avec la même architecture mais avec des tailles différentes, ils servent à fabriquer les moules en SU8 contenant le motif des canaux en positif. Pour le moule contenant les canaux de 5 μm de haut, la largeur est de 50 μm pour les canaux d'alimentation et de drainage et de 5 μm pour le canal central. Pour le moule contenant les canaux de 10 μm de haut, ces dimensions sont de 50 et 10 μm . Pour les canaux de 20 μm de haut, ces dimensions sont de 100 et 20 μm . Enfin, pour les canaux de 40 μm de haut, ces dimensions sont de 100 et 40 μm . Les trous d'alimentation aux extrémités des micro-canaux ont un diamètre de 1 mm. Les canaux d'alimentation et de drainage ont une longueur de 15 mm, et la partie centrale de 8 mm.

A.2 Micro-bifurcations

La figure A.1 présente l'architecture des micro-canaux pour les deux masques verres chromes utilisés pour la réalisation du moule contenant le réseau de micro-bifurcations et contenant également quelques canaux uniques, avec des canaux de hauteur 10 μm (figure A.1, A) ou 20 μm (figure A.1, B). Les deux carrés présents sur le schéma sont les mires permettant l'alignement du moule et du masque lors du processus de photolithographie. Les canaux qui ont une hauteur de 10 μm sur le moule, ont une largeur de 50 μm pour les canaux d'alimentation et de drainage et de 10 μm pour la partie fine. Les autres, ont une largeur de 100 μm pour les canaux d'alimentation et de drainage et 20 μm pour la

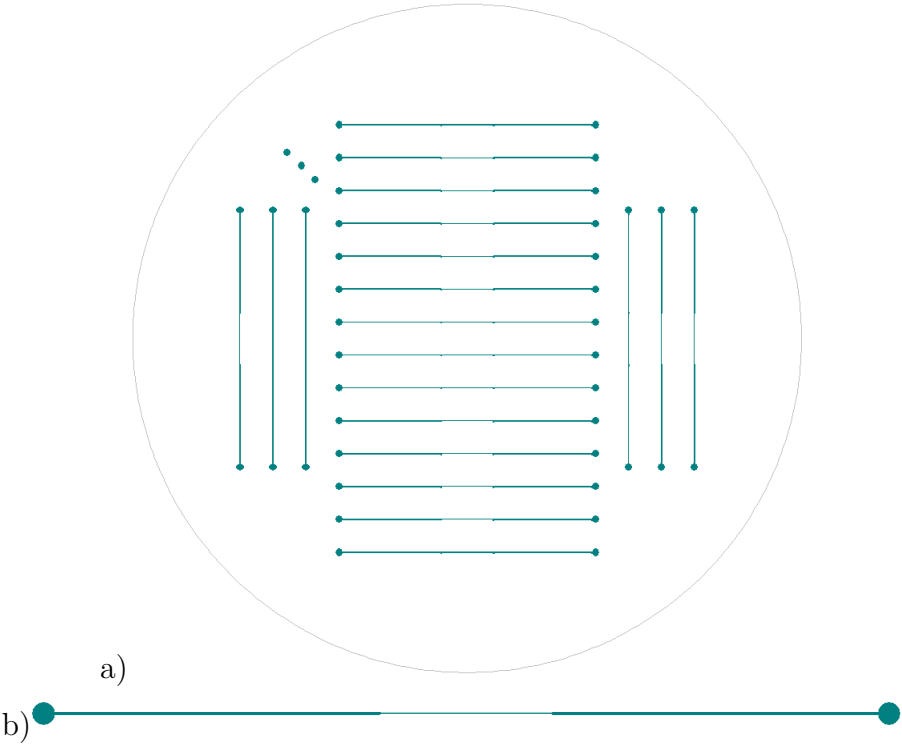


FIGURE A.1: **Plan des masques des micro-canaux uniques droits** (a) et détail d'un canal (b)

partie fine. Le détail d'une bifurcation a été présenté en section 2.1.1.

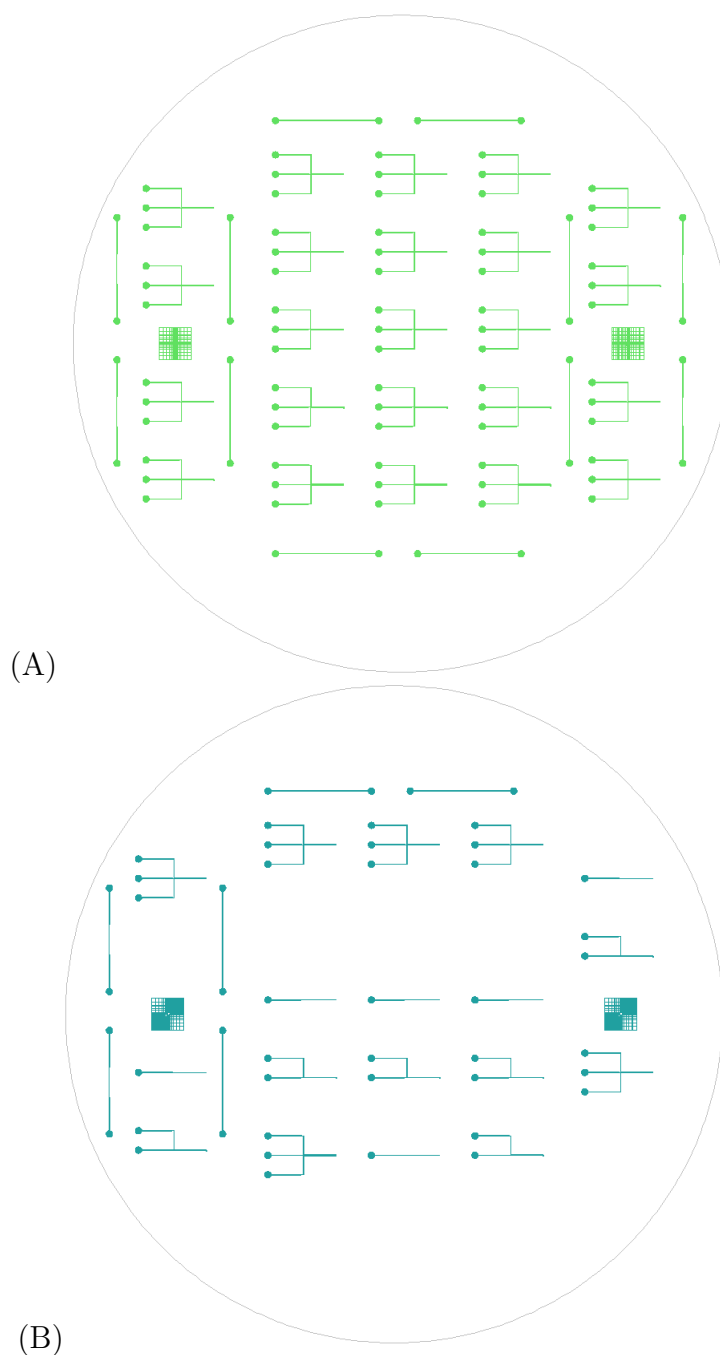


FIGURE A.1: **Plan des masques des micro-bifurcations.** (A) : masque pour la première couche de résine de hauteur $10\mu\text{m}$, (B) : masque pour la deuxième couche de résine de hauteur $10\mu\text{m}$ (hauteur finale $20\mu\text{m}$).

Annexe B

Milieu de suspension des globules rouges

Le milieu de suspension des globules rouges est composé de GASP (Glucose Albumine Sodium Phosphate) et d'Optiprep (Axis-Shield), cf. chapitre 2. Nous devons déterminer les proportions de GASP et d'Optiprep nécessaires dans le milieu final pour que la densité du milieu soit la même que celle des globules rouges (afin d'éviter que les globules rouges ne sédimentent). La densité des globules rouges est comprise entre 1,09 et 1,11 g/mL. Les étapes de la détermination des proportions de GASP et d'Optiprep nécessaires pour être en isodensité avec les globules rouges sont détaillées ci-dessous.

1/ Préparation d'une solution stock : 90 % Optiprep + 10 % de milieu GASP concentré 10 fois. Ceci permet d'obtenir une solution de salinité identique à celle du GASP. Vérifier que le pH de la solution stock est égal à 7,4, sinon l'ajuster avec du HCl.

2/ Dilution de la solution stock avec du milieu GASP pour différentes proportions de solution stock et de GASP, correspondants à des solutions de densités différentes.

3/ Mise en suspension de globules rouges dans ces différents milieux, centrifugation et sélection du milieu qui donne la densité la plus proche de celle des globules rouges. Dans le cas présenté en figure B.1, le milieu *c* est choisi car c'est celui pour lequel les globules rouges sont répartis dans tout l'aliquote après centrifugation. Le milieu de suspension a donc la même densité que les globules rouges.

4/ Milieu final retenu : 35% solution stock/65% GASP. La densité du milieu est mesurée et vaut 1.09 g/mL.

5/ Vérification de l'aspect des globules rouges (visualisation au microscope), qui permet de vérifier la bonne osmolarité du milieu et vérification qu'ils ne sédimentent pas dans le réservoir lors des expériences.

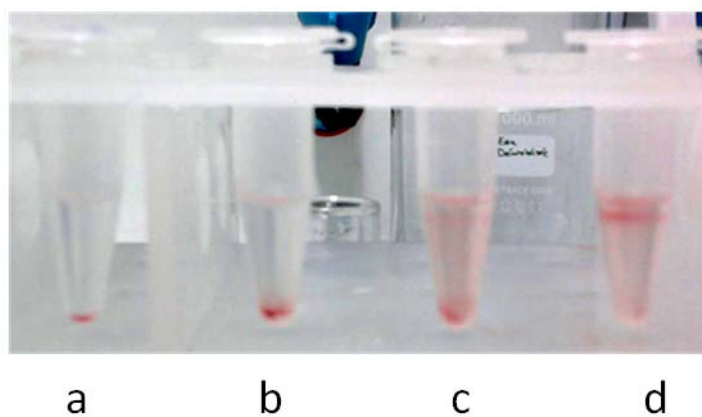


FIGURE B.1: **Suspensions de globules rouges** centrifugées dans un milieu composé de : a) 0% Solution stock, 100% GASP, b) 25% Solution stock, 75% GASP, c) **35% Solution stock, 65% GASP**, d) 45% Solution stock, 55% GASP. Les densités des milieux sont : a) 1,02 g/mL, b) 1,07 g/mL, c) **1,10 g/mL**, d) 1,13 g/mL.

Annexe C

Calculs d'incertitudes

Nous détaillons ici le calcul des incertitudes sur la mesure des débits de globules rouges à partir du profil de vitesse maximale obtenu par *dual-slit* et de l'hématocrite de tube obtenu par comptage (section 3.3). La majorité de nos mesures d'hématocrite de tube ont été réalisées par comptage. De plus, la technique photométrique et la technique par déduction sont basées sur la méthode de mesure de l'hématocrite par comptage. Nous considérons donc seulement les incertitudes sur la méthode de comptage pour mesurer H_t . Nous évaluons également les incertitudes sur la mesure du débit fractionnaire de globules rouges $F_{GR}^i = Q_{GR}^i / Q_{GR}^e$. Par ailleurs, il nous est difficile d'évaluer les incertitudes sur les débits de fluide suspendant (et donc sur les débits fractionnaires de sang total), car nous avons fait des hypothèses fortes sur la forme du profil de vitesse du fluide suspendant. Nous n'estimons donc pas les incertitudes sur cette mesure.

Pour une grandeur a , nous considérons l'incertitude absolue Δa et l'incertitude relative $\Delta a/a$. L'incertitude relative de la grandeur $c = a \times b$ est $\frac{\Delta c}{c} = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2}$. Nous détaillons, dans un premier temps, le calcul de l'incertitude relative sur le débit de globules rouges $\Delta Q_{GR}/Q_{GR}$, puis celle sur le débit fractionnaire de globules rouges $\Delta F_{GR}/F_{GR}$.

C.1 Incertitude sur la mesure du débit de globules rouges

Le débit de globules rouges, lorsqu'il est mesuré à partir du profil de vitesse maximale obtenu par *dual-slit* et de l'hématocrite de tube, est égal à (cf. section 3.3) :

$$Q_{GR} = V_0 \times S \times \left(1 - \frac{B}{3}\right)^2 \times H_t. \quad (\text{C.1.1})$$

- V_0 (en $\mu\text{m/s}$) est la vitesse maximale des globules rouges mesurée par *dual-slit*, que nous pouvons décomposer en : $V_0 = L_s / (T_{max} \times \delta)$, où L_s est la distance de séparation des slits (en pixels), T_{max} est le décalage temporel qui maximise la corrélation (en s) et δ est la calibration spatiale du système optique en pixels/ μm .
 - S (μm^2) est la surface de la section droite du canal et est égale à W^2 où W est la largeur du canal en μm et $W = W_p / \delta$, avec W_p la largeur du canal mesurée en pixels.
 - B est le paramètre d'aplatissement du profil, obtenu par ajustement des résultats expérimentaux suivant l'équation 3.1.
 - H_t est l'hématocrite de tube, et peut être décomposé en : $H_t = \frac{N \times \mathcal{V}_{GR}}{\mathcal{V}_{canal}}$, où N est le nombre moyen de globules rouges comptés dans un volume de canal \mathcal{V}_{canal} (μm^3), et \mathcal{V}_{GR} est le volume d'un globule rouge (μm^3). Le volume du canal en μm^3 est : $\mathcal{V}_{canal} = W_p^2 \times L / \delta^3$, où L est la longueur de canal considérée (en μm).
- Le débit de globules rouges peut donc être réécrit :

$$Q_{GR} = \frac{L_s}{T_{max} \times \delta} \times \frac{W_p^2}{\delta^2} \times \left(1 - \frac{B}{3}\right)^2 \times \frac{N \times \mathcal{V}_{GR}}{W_p^2 \times L / \delta^3} \quad (\text{C.1.2})$$

Après simplification en considérant tous les termes qui entrent en jeu dans la mesure de Q_{GR} , nous écrivons l'incertitude relative comme égale à :

$$\frac{\Delta Q_{GR}}{Q_{GR}} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L_s}{L_s}\right)^2 + \left(\frac{\Delta T_{max}}{T_{max}}\right)^2 + 2\left(\frac{\Delta X}{X}\right)^2 + \left(\frac{\Delta N}{N}\right)^2 + \left(\frac{\Delta \mathcal{V}_{GR}}{\mathcal{V}_{GR}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta L}{L}\right)^2}, \quad (\text{C.1.3})$$

où $\frac{\Delta X}{X}$ est l'incertitude sur le facteur $\left(1 - \frac{B}{3}\right)$.

Nous détaillons, à présent, le calcul de chacun des termes ci-dessus.

- $\frac{\Delta L_s}{L_s}$: L_s est mesurée à 1 pixel près et nous considérons que pour tous nos calculs de *dual-slit* L_s vaut 280 pixels. En effet, pour $\delta = 4,32$ pixels/ μm , cette valeur de L_s correspond à plus de 7 fois la taille d'un globule rouge (distance nécessaire pour que le calcul de corrélation converge). Nous avons donc $\frac{\Delta L_s}{L_s} = \frac{1}{280} = 0,00357$.
- $\frac{\Delta T_{max}}{T_{max}}$: ΔT_{max} dépend de la résolution temporelle du système et vaut $1/F$, où F est la fréquence d'acquisition de la séquence d'images considérée. La vitesse V_0 mesurée dépend de la valeur de T_{max} et vaut $V_0 = \frac{L_s}{T_{max} \times \delta}$. Pour chaque débit mesuré, $\frac{\Delta T_{max}}{T_{max}}$ est calculé et vaut $\frac{\Delta T_{max}}{T_{max}} = \frac{1}{F \times T_{max}}$, avec $T_{max} = \frac{L_s}{V_0 \delta} = \frac{280}{V_0 \times 4,32}$, V_0 étant exprimée en $\mu\text{m/s}$.

- $\frac{\Delta X}{X}$: au vu de nos mesures dans tous nos micro-canaux, nous estimons que l'erreur sur B est de $\pm 0,05$ (sans unité). Avec $X = 1 - B/3$, nous obtenons $\Delta X = 0,017$.
- $\frac{\Delta N}{N}$: d'après nos mesures de comptage de globules rouges, l'erreur sur le nombre moyen de globules rouges dans un volume $\mathcal{V}_{canal} = S \times L$, est de $\Delta N = 2$ globules. De plus, $N = \frac{H_t \times S \times L}{\mathcal{V}_{GR}}$, avec $\mathcal{V}_{GR} = 92 \mu\text{m}^3$ et $L = 140 \mu\text{m}$. Donc $\frac{\Delta N}{N} = 1,32 \times \frac{1}{H_t \times S}$, S étant exprimée en μm^2 .
- $\frac{\Delta \mathcal{V}_{GR}}{\mathcal{V}_{GR}}$: le volume des globules rouges est donné égal à $92 \mu\text{m}^3 \pm 2 \mu\text{m}^3$ dans la littérature, et donc $\frac{\Delta \mathcal{V}_{GR}}{\mathcal{V}_{GR}} = 0,0217$.
- $\frac{\Delta L}{L}$: la longueur de canal considérée pour mesurer l'hématocrite par comptage est de 600 pixels, ce qui correspond à environ $L = 140 \mu\text{m}$. La précision sur L est de 1 pixel (soit $1/4,32 \mu\text{m}$), nous avons donc : $\frac{\Delta L}{L} = \frac{1}{600} = 0,0017$.

Grâce aux relations ci-dessus, nous déterminons une erreur relative moyenne $\frac{\Delta Q_{GR}}{Q_{GR}}$ égale à 16,5 % en moyenne (pour tous nos canaux de section carrée) et qui est principalement due aux erreurs sur la mesure d'hématocrite. En effet, le terme prédominant dans le calcul de $\frac{\Delta Q_{GR}}{Q_{GR}}$ est $\frac{\Delta N}{N}$ et ce terme est d'autant plus grand que l'hématocrite mesuré est petit.

C.2 Incertitude sur la mesure du débit fractionnaire de globules rouges

Lorsque nous considérons maintenant le débit fractionnaire de globules rouges $F_{GR}^i = \frac{Q_{GR}^i}{Q_{GR}^e}$, et que nous reprenons l'équation C.1.2, les incertitudes sur L_s , \mathcal{V}_{GR} et L se simplifient et nous avons :

$$\frac{\Delta F_{GR}^i}{F_{GR}^i} = \sqrt{\left(\frac{\Delta T_{max}^i}{T_{max}^i}\right)^2 + 2\left(\frac{\Delta X^i}{X^i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta N^i}{N^i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta T_{max}^e}{T_{max}^e}\right)^2 + 2\left(\frac{\Delta X^e}{X^e}\right)^2 + \left(\frac{\Delta N^e}{N^e}\right)^2}, \quad (\text{C.2.1})$$

où l'exposant i fait référence à la branche fille i et l'exposant e à la branche d'entrée. Nous déterminons ainsi une erreur relative moyenne sur le débit fractionnaire de globules rouges égale à 22% en moyenne (pour toutes nos micro-bifurcations).

Annexe D

Comparaison des profils de vitesse obtenus par *dual-slit*, et par interférométrie par rétroinjection optique

La technique d'*OFI* (Optical Feedback Interferometry) a déjà été validée pour mesurer des profils de vitesse dans des canaux de 300 μm de diamètre et plus (cf. section 1.3.1.2), mais sa faisabilité dans de petits canaux restait à démontrer. Dans les micro-canaux de section $100\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$, nous avons comparé le profil de vitesse obtenu par la technique de *dual-slit* et d'*OFI*, appliquées à l'écoulement de particules de latex diluées (0,1% v/v) suspendues dans un fluide newtonien, dans une configuration expérimentale pour laquelle la *dual-slit* a déjà été validée. Ce travail, issu d'une collaboration entre le LAAS et l'IMFT, a fait l'objet d'une publication pour le 37ème congrès de la société de biomécanique, reproduite ci-après.

A new optical feedback interferometer for measuring red blood cell velocity distributions in individual capillaries: a feasibility study in microchannels

L. Campagnolo^{a,b,*}, S. Roman^c, J. Perchoux^{a,b} and S. Lorthois^c

^aCNRS, LAAS, 7 Avenue du colonel Roche, F-31400 Toulouse, France; ^bUniv de Toulouse, INP, LAAS, F-31400 Toulouse, France;

^cInstitut de Mécanique des Fluides de Toulouse, UMR CNRS 5502, France

Keywords: microfluidic; optical feedback interferometry; dual-slit

1. Introduction

The dynamics of blood flow in microvascular networks is of great importance in the exchange of nutrient and waste substances between blood and living tissues. In these vessels of diameter less than 100 μm , the development of quantitative methods for measuring the velocity of red blood cells (RBCs) is still challenging. In this context, the dual-slit (DS) technique, a temporal correlation technique first introduced by Wayland and Johnson (1967), is commonly used. Our group has recently shown that, provided that several operational conditions are fulfilled, this technique can provide a precise measurement of the transverse velocity profile of RBCs, i.e. along the x -axis, as shown in Figure 1. The measured velocities are maximal velocities in the depth of the channel, i.e. y direction (Roman et al. 2012). However, this technique requires expensive equipment (high speed camera), and the related data-treatment is time consuming. Moreover, the duration of the acquisition is long (typically 2–40 s). For these reasons, *on line* measurements, especially in cases of transient regimes, are not possible. The aim of this work was to determine whether optical feedback interferometry, a new optical technique in the microfluidic domain which is based on the optical feedback effect in laser diodes, can be used to perform quantitative measurements of RBCs velocity in channels with diameters less than 100 μm . Optical feedback interferometers (OFIs) are indeed compact, low cost and simple sensors. They are known for providing much shorter response times than DS, currently lower than 10 ms, while keeping the precision of traditional Laser Doppler Interferometers. This technique has been previously applied and validated to measure velocity profiles in 300 μm diameter channels (Nikolic et al. 2011), but its feasibility in smaller channels is still to be demonstrated. For that purpose, the velocity profiles obtained by OFI and DS are compared, using polydimethylsiloxane (PDMS) microchannels and spheric monodisperse particle suspensions in set-up configurations where the DS has been previously validated (Roman et al. 2012).

2. Methods

Particle suspensions (0.1%(v/v)) are prepared from a concentrated stock solution of 4 μm diameter latex microspheres (InvitrogenTM, Life Technologies, Saint Aubin, France).

The flow is controlled in rectangular PDMS microchannels of size $20 \times 100 \mu\text{m}$ using a syringe pump (PHD 22/2000 Harvard Apparatus, Holliston, MA) and Hamilton Gastight (Bonaduz, Switzerland) glass syringes.

First, the DS technique is applied. In this technique, the channel under study is transilluminated and two photo-sensors (slits) are positioned, separated by a known distance, L_s , along the vessel axis (z direction in Figure 1). In our case, the slits are regions of interest ($1 \times 3 \text{ pixels}^2$) on images of particle flows recorded using a high speed video camera (PCO Dimax). The time modulation of light, produced by the passage of the particles flowing through the channel, is deduced by performing the sum of grey levels in both slits at each time step. For various distances L_s between the two slits, a cross correlation velocity, $V_{ds} = L_s/T_d$, is obtained, where T_d is the time delay for which the cross-correlation between the two signals is maximum. For an optimal L_s (Roman et al. 2012), the final velocity at a given point on the x -axis represents the maximal velocity in the y direction. Finally, the slits are successively positioned in the x direction to obtain a profile of RBCs maximal velocities.

Then, the OFI technique is applied to the same microfluidic set-up. The optical feedback effect occurs when a portion of the light emitted from a laser is reflected from an external target and reenters the laser cavity (Petermann 1995). For flow measurement, light scattered from a single moving particle that is suspended in a fluid is shifted in frequency by the Doppler effect. The light suffering from optical feedback mixes with the initial light, causing optical interferences inside the laser cavity. By amplifying and analysing the laser junction voltage in the frequency domain, the velocity of the particle can

*Corresponding author. Email: lucie.campagnolo@alumni.enseiht.fr

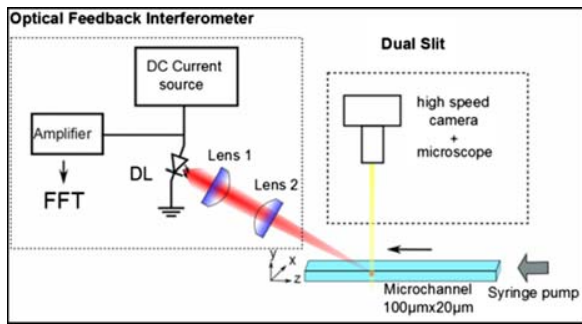


Figure 1. OFI (left) and DS (right) set-ups.

be calculated (Riva et al. 1972). The OFI dedicated experimental set-up was as follows. The laser was a commercial Firecomms vertical cavity surface-emitting laser (VCSEL) lasing at 667 nm. A dual-lens system has been used to minimise the sensing volume, and therefore to improve spatial resolution. The optical head was mounted on a computer-controlled 3-axis motorized micrometer translation stage, and the focus point was stepped through the channel along the x -axis to reconstruct the flow profile. The VCSEL terminal voltage was AC-coupled to a low noise amplifier module and then fed into an analog-to-digital converter for digital signal processing on computer.

For practical purpose, optical system collects light backscattered from a number of different particles. Therefore, the frequency spectrum contains a distribution of frequencies, which corresponds to a distribution of particle velocities. For this configuration, the maximum velocity in the sensing volume can be associated with the 3dB cut-off frequency of the Doppler spectrum (Riva et al. 1972).

Both experimental set-ups are represented in Figure 1. As shown by Roman et al. (2012), in the conditions of this experiment for the DS technique, the measured velocity at each point in the x direction corresponds to the maximal velocity in the depth of the channel (y direction). Similarly, due to the optical configuration, the maximal velocity in the depth of the channel is also measured by the OFI technique.

3. Results and discussion

In order to validate the OFI technique, the laser spot was first focused in the middle of the channel, and the pumping rate was set from 0.1 to 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. The cut-off frequency position varies linearly with the flow rate, showing good agreement with theory (data not shown).

Both reconstructed profiles, and the Newtonian theoretical profile (Patzek and Silin 2001), normalised by the maximal measured velocity, are plotted in Figure 2. The profile shapes are similar for the two techniques showing that OFI is suitable for measuring velocity distributions in such channels.

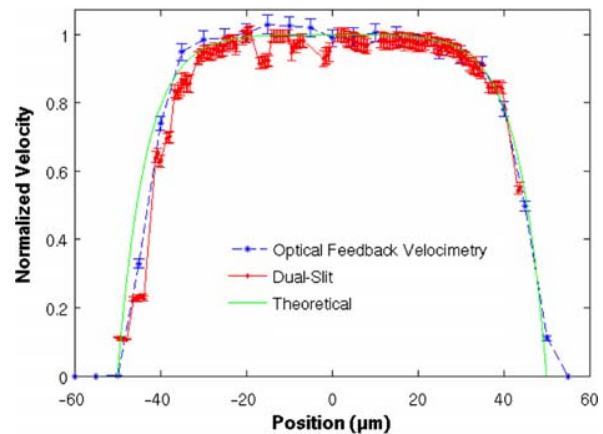


Figure 2. Normalised profiles of maximal velocity measured in a rectangular PDMS channel ($100 \times 20 \mu\text{m}$), using OFI (blue dashed curve) and DS (red plotted curve).

These preliminary results demonstrate the feasibility of OFI measurement in microchannels of size below $100 \mu\text{m}$. The next step is to use both sensing techniques simultaneously in the same experiment in order to perform quantitative comparisons. The technique is then applied on RBCs flow. This promising low-cost technique brings the possibility of real-time applications, such as *in vivo* blood flow measurements. Moreover, OFI technique may have the potential for simultaneous measurement of haematocrit (RBCs volume fraction).

Acknowledgements

This work has been partly supported by BQR 2011 INPT VLAM and GDR CNRS 2760. We also thank David Bourrier from 'Plate forme technologique du LAAS-CNRS'.

References

- Nikolic M, Lim YL, Wilson SJ, Rakic AD, Campagnolo L, Perchoux J, Bosch T. 2011. Flow profile measurement in micro-channels using changes in laser junction voltage due to self-mixing effect. *Sensors IEEE*. 1394–1397.
- Patzek TW, Silin DB. 2001. Shape factor and hydraulic conductance in noncircular capillaries I: one-phase creeping flow. *J Colloid Interface Sci*. 236:295–304.
- Petermann K. 1995. External optical feedback phenomena in semiconductor lasers. *IEEE J Quantum Electron*. 1:480–489.
- Riva C, Benedek GB, Ross B. 1972. Laser Doppler measurements of blood-flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol*. 11:936.
- Roman S, Lorthois S, Duru P, Risso F. 2012. An optimized technique for red blood cells velocity measurement in microvessels. accepted to be published in *J. Biomech.*, abstracts of the 18th Congress of the European Society of Biomechanics.
- Wayland H, Johnson PC. 1967. Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric method. *J Appl Physiol*. 22:333–340.

